



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75450** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 47/48
A61P 35/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

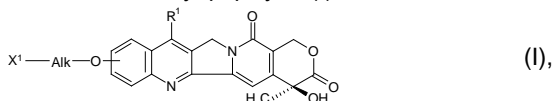
ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

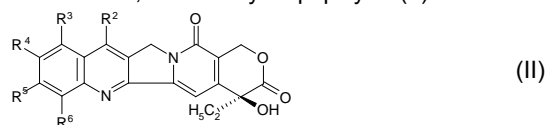
(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІСАХАРИДНИХ КОН'ЮГАТІВ ДЛЯ ПРИГНІЧЕННЯ МЕТАСТАЗІВ АБО ЗАПОБІГАННЯ РЕЦИДИВУ ЗЛОЯКІСНОЇ ПУХЛИНИ

1

- (21) 2004032071
(22) 16.08.2002
(24) 17.04.2006
(86) РСТ/JP02/08309, 16.08.2002
(31) 2001-249717
(32) 21.08.2001
(33) JP
(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.
(72) Кавагуті Такаюкі, JP, Окуно Сатосі, JP, Яно Тосіро, JP
(73) ТАНАБЕ СЕЙЯКУ КО., ЛТД., JP
(56) EP, A, 0 781 781, 02.07.1997
EP, B1, 0 916 348, 19.05.1996
EP, B1, 0 757 049, 24.03.1999
EP, B1, 0 640 622, 09.08.2000
(57) 1. Застосування похідного полісахариду або його солі як активного інгредієнта для приготування лікарського засобу для пригнічення метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини, при якому вказане похідне полісахариду містить полісахарид з карбоксильною групою, зв'язаною з активною речовиною, що має протипухлинну активність, через амінокислоту або пептид, що складається з від 2 до 8 амінокислот, які є однакови чи різними.
2. Застосування за п.1, при якому активною речовиною, що має протипухлинну активність, є похідне камптотецину формули (I):



у якій R^1 являє собою заміщену або незаміщену нижчу алкільну групу, X^1 являє собою групу формули $-NHR^2$, де R^2 являє собою атом водню або нижчу алкільну групу, і Alk, що являє собою C_{1-6} -алкіленову групу з прямим ланцюгом або розгалуженим ланцюгом, що має у ланцюзі за потреби атом кисню, або сполука формули (II):



2

у якій дві групи з-поміж R^2-R^6 , які є суміжними одна відносно одної, об'єднані з утворенням нижчої алкіленової групи, і один з атомів вуглецю зазначеної нижчої алкіленової групи заміщений аміногрупою, а три групи з-поміж R^2-R^6 , що залишилися, являють собою атом водню, нижчу алкільну групу або атом галогену.

3. Застосування за пп.1 або 2, при якому полісахарид, що має карбоксильну групу, являє собою карбокси- C_{1-4} -алкілдекстран або карбокси- C_{1-4} -алкілдекстранполіспирт.

4. Застосування за пп.1 або 2, при якому полісахарид, що має карбоксильну групу, являє собою карбокси- C_{1-4} -алкілдекстран.

5. Застосування за будь-яким з пунктів 1-4, при якому пептид вибирають з групи, що включає гліцил-гліцил-L- або D-фенілаланіл-гліцин, гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцил-гліцин, L- або D-фенілаланіл-гліцин, L- або D-тирозил-гліцин, L- або D-лейцил-гліцин, L- або D-фенілаланіл-цитрулін і L- або D-валіл-цитрулін.

6. Застосування за п.1, при якому полісахарид, що має карбоксильну групу, являє собою карбоксиметильований декстран, активна речовина, що має протипухлинну активність, являє собою 10-(3'-амінопропілокси)-7-етил-(2OS)-камптотецин, а пептид являє собою гліцил-гліцил-гліцин.

7. Застосування за п.1, при якому полісахарид, що має карбоксильну групу, являє собою карбокси- C_{1-4} -алкілдекстранполіспирт, активна речовина, що має протипухлинну активність, являє собою (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-

бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діон і пептид являє собою гліцил-гліцил, L- або D-фенілаланіл-гліцин.

8. Застосування за п.1, при якому лікарський засіб являє собою фармацевтичну композицію для пригнічення метастазів злоякісної пухлини.

9. Застосування за п.1, при якому лікарський засіб являє собою фармацевтичну композицію для запобігання рецидиву злоякісної пухлини.

(13) **C2**

(11) **75450**

(19) **UA**

Даний винахід стосується фармацевтичної композиції для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини. Зокрема, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини, яка містить як активний інгредієнт похідне полісахариду, що включає полісахарид з карбоксильною групою, зв'язаною з активною речовиною, що має протипухлинну активність, наприклад, похідним камптотецину формули (I) або (II), як згадано нижче, через амінокислоту або пептид, що складається з 2-8 амінокислот, які є однаковими чи різними, або його сіль.

Злоякісні пухлини є однією з головних причин смерті у розвинутих країнах, і більшість смертей, пов'язаних із злоякісними пухлинами, відбуваються через метастази у віддалені органи або рецидив, супроводжуваний метастазом у віддалені органи після місцевої терапії. Метастази у віддалених органах можуть бути викликані гематогенним метастазом або лімфогенним метастазом і відомо, що пацієнт, який має лімфогенний метастаз, схильний до високого ризику рецидиву злоякісної пухлини після місцевої терапії. Основними органами для рецидиву є мозок, легеня, печінка і кістка. Особливо, пухлина у травних органах, наприклад, рак товстої кишки, від якого страждає велика кількість пацієнтів, може вторгтися і поширюватися на печінку, а рак грудей і рак легені також часто вторгається і поширюється на печінку. Далі, лімфома і лімфатичний лейкоз можуть поширюватися головним чином на лімфатичну систему і є відомістю, що під час розтину виявляли метастази у печінці з високою частотою.

Щоб інгібувати рецидив, включаючи метастаз у віддалені органи, такий як метастаз в печінку, і для того, щоб продовжити життя, застосовують хіміотерапію та інші методи підтримувального лікування після місцевої терапії, але хіміотерапія має велику токсичність і не може використовуватися для постійного застосування. Крім того, майже не повідомлялося, що тривалість життя у більшій мірі продовжується за допомогою підтримувального лікування у вигляді хіміотерапії, ніж за допомогою однієї місцевої терапії. Наприклад, у досліджах з хіміотерапії на пацієнті, який був об'єктом хірургічного втручання з приводу широкого раку шлунка, одного з ракових утворень травних органів, проводили клінічні випробування різних агентів проти злоякісних пухлин, але жоден терапевтичний метод, який демонстрував би помітно кращий ступінь виживання, ніж одна хірургія, не був встановлений.

За цих обставин було б бажаним знайти новий агент, ефективний для інгібування рецидиву або для продовження життя після місцевої терапії, застосовний щодо метастазів лімфатичних вузлів і віддалених органів з незначними побічними ефектами і придатний для постійного введення.

З іншого боку, [WO 94/19376, WO 97/46260, WO 97/38727, JP-A-10-72467 і JP-A-10-95802] розкривають полісахаридне похідне, що включає полісахарид, зв'язаний з активною речовиною з протипухлинною активністю через амінокислоту або

пептид.

Однак ці публікації розкривають застосування вказаних полісахаридів для лікування ракових утворень шляхом накопичення їх в ділянці пухлини і знищення пухлинних клітин, але ніде не зазначена активність щодо інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини.

Об'єктом даного винаходу є одержання нової фармацевтичної композиції для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісних пухлин.

Були проведені численні дослідження і було виявлено, що похідне полісахариду, яке включає полісахарид з карбоксильною групою, зв'язаною через амінокислоту або пептид з активною речовиною, що має протипухлинну активність, справляє чудову дію при інгібуванні метастазів і/або у запобіганні рецидиву злоякісної пухлини, що дозволило здійснити даний винахід. Таким чином, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини, яка включає як активний інгредієнт похідне полісахариду, що включає полісахарид з карбоксильною групою, зв'язаною з активною речовиною, що має протипухлинну активність, через амінокислоту або пептид, що складається з 2-8 амінокислот, які є однаковими чи різними, або його сіль.

Фіг.1 показує кількість днів, що минули після імплантації пухлини, та число тварин, які вижили, на моделях метастазу печінки M 5076.

Полісахарид з карбоксильною групою, відповідно до даного винаходу, включає ті ж самі полісахариди, які розкриті у вищезазначених [WO 94/19376 і WO 97/46260], і включає полісахариди з карбоксильними групами, що первинно містяться у його структурі (наприклад, гіалуронова кислота, пектинова кислота, альгінова кислота, хондроїтин, гепарин і т.д.), і полісахариди, що первинно не містять карбоксильні групи (наприклад, пулулан, декстран, манан, хітин, маноглюкан, хітозан і т.д.), але які вводяться в них, і полісахариди, що не мають первинно карбоксильної групи у своїй структурі, але в які карбоксильні групи вводяться після утворення поліспиртів (наприклад, полісахарид поліспирт, що має карбоксильну групу).

Полісахарид, що не має первинно карбоксильної групи, але в який вводиться карбоксильна група, означає полісахариди, які одержують заміщенням атома водню частини або всіх гідроксильних груп полісахаридів, що не мають первинно карбоксильної групи, на карбокси-С₁₋₄-алкільну групу.

У даному винаході полісахарид включає ті ж самі полісахариди, які одержують обробкою полісахариду, що первинно не має карбоксильної групи, за допомогою відновного агента, з наступним заміщенням атома водню частини або всіх гідроксильних груп утвореної сполуки на карбокси-С₁₋₄-алкільну групу.

Полісахарид поліспирт, що має карбоксильну групу, включає, наприклад, карбокси-С₁₋₄-алкілполісахарид поліспирт, який одержують обробкою полісахариду, що первинно не має карбоксильної групи, послідовно періодатом натрію і боргидридом натрію за способом, [описаним у WO

97/46260], з одержанням полісахариду поліспирту, який далі обробляють галогенованою C₁₋₄-алкілкарбоною кислотою.

Алкільна частина карбокси-C₁₋₄-алкільної групи, яка заміщує атом водню гідроксильних груп вищезазначеного полісахариду (включаючи полісахарид поліспирт), може бути або алкільною групою з лінійним ланцюгом, або алкільною групою з розгалуженим ланцюгом.

Переважаючою карбокси-C₁₋₄-алкільною групою є, наприклад, карбоксиметильна група, 1-карбоксиметильна група, 3-карбоксипропильна група, 1-метил-3-карбоксипропильна група, 2-метил-3-карбоксипропильна група, 4-карбоксибутильна група і т.д., і карбоксиметильна група є найбільш переважною.

У даному винаході полісахарид, що має карбоксильну групу, переважно являє собою карбокси-C₁₋₄-алкілдекстран або карбокси-C₁₋₄-алкілдекстран поліспирт, і карбокси-C₁₋₄-алкілдекстран є особливо переважним.

Ступінь утворення поліспирту (шляхом послідовного окиснення періодатом натрію і відновлення боргидридом натрію) на стадії одержання карбокси-C₁₋₄-алкілполісахариду поліспирту, згаданого вище, не визначено, але проміжний полісахарид поліспирт переважно одержують обробкою полісахариду за умов, що дозволяють по суті майже повне утворення поліспирту.

Більш того, у даному винаході полісахарид, що має карбоксильну групу, переважно являє собою карбоксиметильований декстран або карбоксиметильований декстран поліспирт, і серед цих полісахаридів особливо переважним є декстран, що має середню молекулярну вагу від 20000 до 500000, і декстран, що має середню молекулярну вагу від 50000 до 350000, є найбільш переважним (зазначена середня молекулярна вага визначається методом гель-проникної хроматографії (GPC), [Shinsekagaku, Jikken Koza, Vol.20, p.7, Tokyo-Kagaku-Dojin, 5.11.1991]).

При введенні карбоксилалкільної групи у полісахариди ступінь її введення виражається як "ступінь заміщення", який визначається числом карбоксилалкільних груп (включаючи групи пептидного ланцюга, що вводяться цими групами) з розрахунку на залишок цукру. Це виражене наступним рівнянням:

Ступінь заміщення =

$$= \frac{\text{кількість карбоксилалкільних груп у молекулі}}{\text{загальна кількість залишків цукру у молекулі}}$$

Якщо карбоксилалкільною групою є карбоксиметильна група, ступінь заміщення іноді виражається ступенем карбоксиметилування (СМ-ступінь).

Якщо полісахарид являє собою декстран, ступінь його заміщення знаходиться переважно в діапазоні від 0,3 до 0,8. Якщо полісахарид являє собою декстран поліспирт, ступінь заміщення знаходиться переважно в діапазоні від 0,3 до 0,5.

Амінокислота або пептид даного винаходу відіграють роль спейсера (зв'язувальної ланки), існуючого між полісахаридом, що має карбоксильну групу, і активною речовиною, що має протипухлинну активність, і амінокислота чи амінокислота, що утворює зазначений пептид, включає природні

амінокислоти і синтетичні амінокислоти (включаючи D-амінокислоти, L-амінокислоти, їхню суміш), і також включає як нейтральні амінокислоти, основні амінокислоти, так і кислі амінокислоти. Крім того, амінокислота даного винаходу може бути не тільки α-амінокислотою, але також й β-амінокислотами, γ-амінокислотами, ε-амінокислотами і т.д.

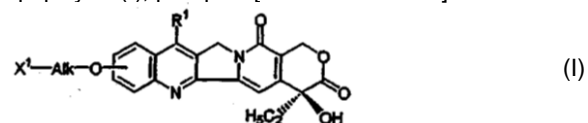
Прикладами амінокислот є гліцин, α-аланін, β-аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, метіонін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, цитрулін, аргінін, фенілаланін, тирозин, гістидин, триптофан, пролін, гідроксипролін, γ-аміномасляна кислота, ε-амінокапронова кислота і т.д.

Пептид даного винаходу включає пептид, що складається з 2-8 амінокислот, переважно 2-5 амінокислот, які є однаковими чи різними. Прикладами пептидів є гліцил-гліцил-L- або D-фенілаланіл-гліцин, гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцил-гліцин, L- або D-фенілаланіл-гліцин, L- або D-тирозил-гліцин, L- або D-лейцил-гліцин, L- або D-фенілаланіл-цитрулін і L- або D-валіл-цитрулін (N-кінець цих пептидів введений у карбоксильній групі полісахариду).

Серед цих пептидів переважними є гліцил-гліцил-L- або D-фенілаланіл-гліцин, гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцин, гліцил-гліцил-гліцил-гліцил-гліцин і L- або D-фенілаланіл-гліцин.

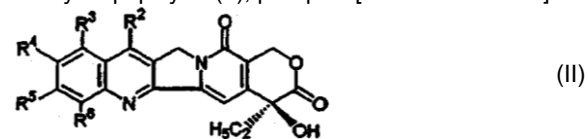
Активна речовина, що має протипухлинну активність за даним винаходом, може включати різні сполуки, відомі як протипухлинний агент, і може бути цитотоксичними агентами або цитостатичними агентами. Цитотоксичний агент являє собою переважно похідні камптотецину і похідні таксану, і цитостатичний агент являє собою переважно інгібітори ангіогенезу, інгібітори рецептора EGF. Більш переважно, цитотоксичний агент являє собою похідні камптотецину і цитостатичний агент являє собою інгібітори ангіогенезу.

Прикладами похідних камптотецину є сполуки формули (I), розкриті [в JP-A-10-72467]:



де R¹ являє собою заміщену або незаміщену нижчу алкільну групу, X¹ являє собою групу формули: -NHR² (R² являє собою атом водню або нижчу алкільну групу) і Alk являє собою C₁₋₆-алкіленову групу з лінійним ланцюгом або розгалуженим ланцюгом, що має за потреби в ланцюзі атом кисню. Серед них переважно є сполука 10-(3'-амінопропілокси)-7-етил-(20S)-камптотецин.

Іншими прикладами похідних камптотецину є сполуки формули (II), розкриті [в JP-A-10-95802]:



де дві групи з числа від R² до R⁶, що є суміжними одна з одною, об'єднані з утворенням нижчої

алкіленової групи, і один з атомів вуглецю зазначеної нижчої алкіленової групи заміщений аміногруппою, і три групи, що залишилися, з числа від R^2 до R^6 являють собою атом водню, нижчу алкілну групу або атом галогену. Серед них переважною є сполука (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діон і т.д.

Прикладами похідних таксану є таксол, таксо-тер, 13-[(2'R,3'R)-3'-N-трет-бутилоксикарбоніл-3'-циклопропіл]-10-дезацетилбакатин III і т.д.

В активному інгредієнті даного винаходу відношення полісахариду і активної речовини, що має протипухлинну активність, може бути обране відповідно до виду полісахариду, який повинен бути використаний, але якщо полісахаридом є декстран або декстран поліспирт, тоді вміст активної речовини, що має протипухлинну активність, переважно знаходиться в інтервалі від 0,1 до 20% за вагою, більш переважно, в інтервалі від 2 до 10% за вагою, з розрахунку на загальну вагу активного інгредієнта.

Серед активних інгредієнтів даного винаходу переважними є полісахаридні похідні або їхні солі, в яких амінокислота чи пептид, що складається з 2-8 амінокислот, які є однаковими або різними, введені у частину чи у всі карбоксильні групи полісахариду, що має карбоксильну групу, через кислотно-амідний зв'язок, і частина, що залишилася, або всі аміногрупи чи карбоксильні групи, які не беруть участі у зв'язуванні з карбоксильними групами вищезазначеного пептиду, зв'язані з карбоксильними групами, аміногрупами або гідроксильними групами активної речовини, що має протипухлинну активність, через кислотно-амідний зв'язок або складний ефірний зв'язок.

Особливо переважним активним інгредієнтом є похідне полісахариду, в якому полісахаридом, що має карбоксильну групу, є карбоксиметильований декстран, активною речовиною, що має протипухлинну активність, є 10-(3'-амінопропілокси)-7-етил(20S)-камптотетин і пептидом є гліцил-гліцил-гліцин, або його сіль. Особливо переважним є похідне полісахариду, в якому полісахаридом, що має карбоксильну групу, є карбоксиметильований декстран, що має середню молекулярну вагу від 60000 до 200000, і ступінь карбоксиметилування його знаходиться в діапазоні від 0,3 до 0,8, або його сіль.

Іншим переважним активним інгредієнтом є похідне полісахариду, в якому полісахаридом, що має карбоксильну групу, є карбокси- C_{1-4} -алкілдекстран поліспирт, активною речовиною, що має протипухлинну активність, є (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]-хінолін-10,13(9H,15H)-діон і пептидом є гліцил-гліцил-L- чи D-фенілаланіл-гліцин, або його сіль, і особливо переважними є похідне полісахариду або його сіль, у якому полісахаридом, що має карбоксильну групу, є карбокси- C_{1-4} -алкілдекстран поліспирт, що має середню молекулярну вагу від 200000 до 400000, і ступінь заміщення його знаходиться в діапазоні від 0,3 до 0,5.

Похідне полісахариду або сіль активного інг-

редієнта даного винаходу можуть бути одержані згідно з способам, розкритим [у WO 94/19376, WO 97/46260, WO 97/38727, JP-A-10-72467 і JP-A-10-95802].

Фармацевтична композиція даного винаходу може активно накопичуватися у сайті, такому як лімфатичний вузол або печінка, на які може поширюватися ракова пухлина, може вивільняти активну речовину з відповідною швидкістю так, щоб активна речовина ледве зачіпала нормальні клітини і пригнічувала зростання клітин пухлини, і отже, фармацевтична композиція даного винаходу застосовна для інгібування метастазів або для запобігання рецидиву злоякісної пухлини. Фармацевтична композиція даного винаходу особливо застосовна для інгібування метастазів лімфатичних вузлів або метастазів печінки, зокрема, корисна для інгібування метастазів лімфатичних вузлів. Крім того, серед метастазів лімфатичних вузлів дана фармацевтична композиція застосовна для інгібування метастазування в лімфатичні вузли з товстої кишки або метастазування в лімфатичні вузли з легені.

Крім того, дана фармацевтична композиція може чинити дію не тільки перед початком появи метастазів, але також й після початку утворення метастазів. Тому дана фармацевтична композиція також застосовна для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини після місцевої терапії (наприклад, хірургії, променевої терапії, термотерапії, кріотерапії, лазероспалювальної терапії і т.д.). Крім того, дана фармацевтична композиція також підходить для повторного дозування протягом тривалого часу і може використовуватися разом з місцевою терапією.

Дана фармацевтична композиція переважно вводиться парентерально (наприклад, внутрішньовенною ін'єкцією) і звичайно вводиться у формі рідкого складу, такого як розчин, суспензія, емульсія і т.д.

Дана фармацевтична композиція переважно приготровляється у формі ін'єкції або краплинного вливання, використовуючи дистильовану воду для ін'єкції, фізіологічний сольовий розчин, водний розчин глюкози.

Дозування даної фармацевтичної композиції може змінюватися залежно від способів введення, віку, ваги або стану пацієнтів і т.д., але вона знаходиться звичайно в межах від 0,002 до 50мг/кг, більш переважно в межах від 0,01 до 5мг/кг, у разовій дозі, в перерахунку на кількість активної речовини.

У даному описі нижчою алкільною групою і нижчою алкіленовою групою може бути група, що має від 1 до 6 атомів вуглецю, переважно, має від 1 до 4 атомів вуглецю, і атомом галогену є атом фтору, атом хлору, атом бром, атом йоду і т.д.

Приклади

Експеримент 1 (моделі метастазу печінки M 5076)

Один мільйон клітин M 5076 (клітини саркоми яєчників миші) імплантують самцям мишей BDF1 (5-тижневого віку, 8 тварин у групі) у хвостову вену. Тестовану сполуку (сполуку А; сполуку, одержану як описано нижче у розділі Препарат 1, і іринотекан (CPT-11) розчиняють у фізіологічному

сольовому розчині і кожну кількість, зазначену у Таблиці 1, як згадано нижче, вводять внутрішньовенно мишам на 4-ий, 8-ий і 12-ий день після імплантації, і мишей спостерігають протягом 120 днів після імплантації пухлини. У контрольній групі (не обробленій тестованою сполукою) вводять тільки фізіологічний сольовий розчин. Спостерігали час виживання (дні) у групах, оброблюваних тестованими сполуками, та у контрольній групі, і рівень продовження життя розраховують згідно з наступним рівнянням.

Результати показані у Таблиці 1 та на Фіг.1.

Рівень продовження життя =

$$= \frac{\text{дні життя у групі, обробленій тестованою сполукою}}{\text{дні життя у конкретній групі}} \times 100$$

Таблиця 1

	Доза (мг/кг)	Дні життя	Стандартна помилка	Рівень про- дов-ження життя (%)
Контроль		15,00	1,24	-
Сполука А	12,5	37,57	5,27	150,5
	25	43,13	5,98	187,5
	50	48,71	5,33	224,8
Іринотекан	80	22,50	0,5	50,0

Як показано у Таблиці 1, сполука, одержана як описано нижче у розділі Препарат 1 (сполука А), виявляє чудову активність стосовно продовження життя на моделях метастазу печінки М5076. Необхідно відзначити, що іринотекан не відомий як засіб для інгібування метастазів або запобігання рецидивам злоякісної пухлини, а він був просто протестований як лікарський засіб з ряду похідних камптотецину.

Експеримент 2 (метастатичні моделі НТ-29)

Сегмент (2мм²) НТ-29 клітин (рак товстої кишки людини) імплантують у червоподібний відросток самці миші 100NCr пі/пі (5-6-тижневого віку, 10 тварин у групі). Тестовану сполуку (сполука А; сполуку, одержану, як згадано нижче у розділі Препарат 1, сполуку В; сполуку, одержану, як згадано нижче у розділі Препарат 4, і іринотекан (СРТ-11) розчиняють у фізіологічному сольовому розчині, і кожну кількість, зазначену у наведеної нижче Таблиці 2, вводять внутрішньовенно мишам на 15-ий, 19-ий, 23-ий і 25-ий день після імплантації пухлини. З іншого боку, контрольній групі (не обробленій тестованою сполукою) вводять тільки фізіологічний сольовий розчин. Присутність або відсутність метастазів кожного органа перевіряють на 84-ий день після імплантації пухлини.

Результати показані у наступній Таблиці 2.

Таблиця 2

Група	Число тварин	Лімфатичний вузол		Печінка		Легеня		Інші органи ***		Число тварин з метастазами	
		МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**
Сполука А (40мг/кг)****	10	0	<0,01	0	1,0	0	0,21	0	1,0	0	<0,01
Сполука А (20мг/кг)****	10	1	<0,01	0	1,0	1	0,58	0	1,0	2	<0,01
Сполука А (10мг/кг)****	10	8	1,0	0	1,0	2	1,0	0	1,0	8	1,0
Сполука А. (5мг/кг)****	10	6	0,3	0	1,0	1	0,58	2	1,0	6	0,30
Сполука В (5мг/кг)*****	10	0	<0,01	0	1,0	0	0,21	0	1,0	0	<0,01
Сполука В (2,5мг/кг)*****	10	6	0,30	1	1,0	1	0,58	1	1,0	6	0,3
Іринотекан (40мг/кг)	10	7	0,58	0	1,0	1	0,58	1	1,0	7	0,58
Іринотекан (20мг/кг)	10	9	1,0	2	1,0	2	1,0	0	1,0	9	1,0
Контроль	10	9	-	1	-	3	-0000000	1	-	9	-

*МІ означає частоту метастазування.

**Р означає стандартне відхилення, де всі оброблювані групи порівнюють з контролем за допомогою точного критерію Фішера.

*** - Включаючи діафрагму, черевну порожнину і грудну порожнину.

**** - Дозування в перерахунку на 10-(3'-амінопропілокси)-7-етил-(208)-камптотецин.

***** - Дозування з розрахунку на (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1Н,12Н-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно [1,2-b]хінолін-10,13 (9Н,15Н)-діон.

Експеримент 3 (метастатичні моделі НТ-29)

Сегмент (2мм²) клітин НТ-29 (рак товстої кишки людини) імплантують в vermiform апендикс самці миші 100NCr пі/пі (5-6 тижнів, 10 тварин у групі). Оскільки метастази лімфатичного вузла спостерігають на 49-ий день після імплантації пухлини, тестовану сполуку (сполука А; сполуку, одержану як згадано нижче у розділі Препарат 1, і іринотекан - (СРТ-11)) розчиняють у фізіологічно-

му сольовому розчині, і кожну кількість, зазначену у згаданій нижче Таблиці 3, вводять внутрішньовенно мишам на 51-ий, 55-ий, 59-ий і 63-ий день після імплантації пухлини. З іншого боку, контрольній групі (не обробленій тестованою сполукою) вводять тільки фізіологічний сольовий розчин. Присутність або відсутність метастазів у кожному органі перевіряли на 84-ий день після імплантації пухлини.

Результати показані у наступній Таблиці 3.

Таблиця 3

Група	Число тварин	Лімфатичний вузол		Печінка		Легеня		Інші органи ***		Число тварин з метастазами	
		МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**
Сполука А (40мг/кг)****	10	0	<0,01	0	1,0	0	0,21	2	1,0	2	<0,01
Сполука А (20мг/кг)****	10	2	<0,01	0	1,0	0	0,21	1	1,0	3	<0,01
Іринотекан (40 мг/кг)	ю	8	1,0	1	1,0	0	0,21	1	1,0	8	1,0
Контроль	10	9	-	1	-	3	-	1	-	9	-

*МІ означає частоту метастазування.

**Р означає стандартне відхилення, де всі оброблювані групи порівнювали з контролем за допомогою точного критерію Фішера.

*** - Включаючи діафрагму, черевну порожнину і грудну порожнину.

**** - Дозування в перерахунку на 10-(3'-амінопропілоксі)-7-етил-(20S)-камптотецин.

Експеримент 4 (метастатичні моделі H460)

Сегмент (2мм²) клітин H460 (рак легені людини) імплантують в ліву легеню самки миші 100NCr nu/nu (5-6 тижнів, 10 тварин у групі). Оскільки метастази спостерігають на 14-ий день після імплантації пухлини в іншій контрольній групі, тестовану сполуку (сполуку А; сполуку, одержану як згадано нижче у розділі Препарат 1, сполуку В; сполуку, одержану як згадано нижче у розділі Препарат 4, і іринотекан (CPT-11) розчиняють у фізіологічному

сольовому розчині, і кожену кількість, зазначену у згаданій нижче Таблиці 4, вводять внутрішньовенно мишам на 14-ий, 18-ий, 22-ий і 26-ий день після імплантації пухлини. З іншого боку, контрольній групі (не обробленій тестованою сполукою) вводять тільки фізіологічний сольовий розчин. Присутність або відсутність метастазів кожного органа перевіряють на 36-й день після імплантації пухлини.

Результати показані у наступній Таблиці 4.

Таблиця 4

Група	Число тварин	Лімфатичний вузол		Печінка		Легеня		Число тварин з метастазами	
		МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**	МІ*	Р**
Сполука А (40мг/кг)****	10	1	<0,01	0	1,0	0	0,54	1	<0,01
Сполука А (20мг/кг)****	10	2	0,05	0	1,0	2	0,58	3	0,245
Сполука А (10мг/кг)****	10	1	<0,01	0	1,0	0	0,54	1	0,02
Сполука А. (5мг/кг)****	10	2	0,05	0	1,0	1	1,0	2	0,06
Сполука В (5мг/кг)*****	10	2	0,05	0	1,0	1	1,0	2	0,06
Сполука В (2,5мг/кг)*****	10	1	<0,01	0	1,0	0	0,54	1	0,02
Іринотекан (40мг/кг)	10	0	<0,01	0	1,0	1	1,0	1	0,02
Іринотекан (80мг/кг)	10	2	0,05	0	1,0	0	0,54	2	0,06
Контроль	20	13	-	0	-	2	-	12	-

*МІ означає частоту метастазування.

**Р означає стандартне відхилення, де всі оброблювані групи порівнюють з контролем за допомогою точного критерію Фішера.

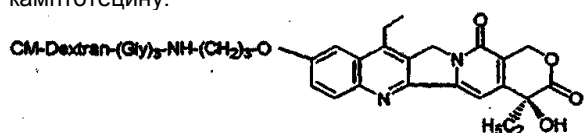
**** - Дозування в перерахунку на 10-(3'-амінопропілоксі)-7-етил-(20S)-камптотецин.

***** - Дозування в перерахунку на (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1Н,12Н-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізо[1,2-b]хінолін-10,13 (9Н,15Н)-діон.

ПРЕПАРАТИ

Препарат 1

Одержання СМ-декстран-7-етил-10-[3-гліцил-гліцил-гліциламіно)пропілоксі]-(20S)-камптотецину:



(СМ-декстран означає карбоксиметилдекстран, надалі те ж саме).

(1) Гідрохлорид 10-(3'-амінопропілоксі)-7-етил-(20S)-камптотецину (500мг) розчиняють в ацетонітрилі (25мл), потім туди ж послідовно додають трет-бутоксикарбонілгліцил-гліцил-гліцин (345мг), N-метилморфолін (121мг), N-гідроксибензотриазол (161мг) і гідрохлорид 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду (228мг) і суміш перемішують протягом ночі. Продукт, що випав в осад, збирають

шляхом фільтрування, очищують за допомогою хроматографії на колонці з силікагелем з одержанням порошку біло-жовтого кольору, схожого на піну, який перекристалізують з н-пропанолу з одержанням 7-етил-10-[3'-(трет-бутоксикарбоніл-гліцил-гліциламіно)пропілокси]-(20S)-камптотецину (663мг) у вигляді безбарвних кристалів. Т.пл.: 157-159°C.

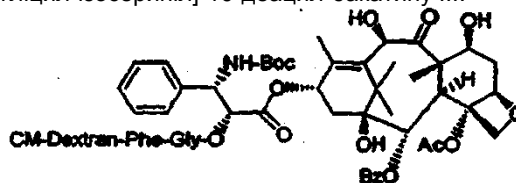
(2) 7-етил-10-[3'-(трет-бутоксикарбоніл-гліцил-гліциламіно)пропілокси]-(20S)-камптотецин (3,86г) емульгують в очищеній воді (64мл) і туди додають 6N водний розчин соляної кислоти (32мл) і проводять реакцію за кімнатної температури при перемішуванні протягом 2 годин. Розчинник концентрують і до залишку додають н-пропанол, щоб осадити порошкоподібний продукт. Одержаний порошкоподібний продукт збирають за допомогою фільтрування і перекристалізують з водного н-пропанолу з одержанням гідрохлориду 7-етил-10-[3'-(гліцил-гліцил-гліциламіно)пропілокси]-(20S)-камптотецину (2,56г) у вигляді кристалів жовтого кольору.

(3) Натрієву сіль CM-декстрану (CM-ступінь =0,44, 50 г) розчиняють у воді (2,5 літри) і значення рН доводять до величини 5,0 за допомогою 0,2N водного розчину соляної кислоти при перемішуванні за температури 15°C і до нього додають гідрохлорид 7-етил-10-[3'-(гліцил-гліцил-гліциламіно)пропілокси]-(20S)-камптотецину (4,01г). До зазначеної суміші додають 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіімід гідрохлорид (50г), при цьому значення рН реакційного розчину підтримують на рівні 5,0-5,5 за допомогою 0,2N соляної кислоти. Суміш реагує при температурі 15°C при перемішуванні протягом години, після чого її розбавляють очищеною водою до загального обсягу 10 літрів. Поки значення рН підтримують вище 4,0, низькомолекулярні фракції видаляють, використовуючи ультрафільтраційний модуль (ACP-1010, випущений Asahi Kasei Industries, Ltd.), і значення рН доводять до 8 за допомогою 0,1N водного розчину гідроксиду натрію і потім обробляють іонообмінною смолою MSC-I (Na-форма, випущена фірмою Dowex). Фракції, що містять цільові сполуки, концентрують і пропускають крізь фільтр (0,45мкм). Одержаний продукт змішують з етанолом (10 літрів) при перемішуванні і до нього додають по краплях 3M розсіл (40мл) при перемішуванні. Одержаний осад збирають фільтруванням і розчиняють в очищеній воді (21 літр). Значення рН розчину доводять до величини рН 4,0 за допомогою 0,2N водного розчину соляної кислоти і піддають знову ультрафільтруванню, протягом якого значення рН підтримують на рівні 4,0. Розчинник концентрують до загального обсягу 1,5 літри і відфільтровують через фільтр (0,45мкм). Одержаний продукт змішують з етанолом (9 літрів), після чого при перемішуванні додають по краплях 3M розсіл (35мл). Одержаний осад збирають фільтруванням і промивають послідовно етанолом та ацетоном, концентрують при пониженому тиску, що дає цільову сполуку (54,9г) у вигляді порошку біло-жовтого кольору. Вміст щодо гідро хлориду 10-(3'-амінопропілокси)-7-етил-(20S)-камптотецину склав 4,2%, як підтверджено за поглинанням при

367,5нм. Згідно з аналізом, за допомогою GPC (гельпроникної хроматографії) середня молекулярна вага цільового продукту склала 121кДа і ступінь розподілу (мв/мн) склав 1,47.

Препарат 2

Одержання CM-декстран-13-[(2'R,3'S)-3'-N-трет-бутоксикарбоніл-3'-феніл-2'-O-b-фенілаланіл-гліцил-ізосериніл]-10-деацил-бакатину III:

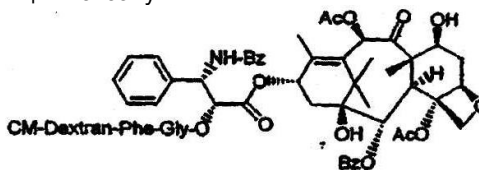


(Bz означає бензоїльну групу, надалі те ж саме).

CM-декстран (2008мг, CM-ступінь: 0,47, середня молекулярна вага 170кДа) розчиняють при перемішуванні в очищеній воді (90мл), після чого додають мезилат 13-[(2'R,3'S)-3'-N-трет-бутоксикарбоніл-3'-феніл-2'-O-L-фенілаланіл-гліцил-ізосериніл]-10-деацил-бакатину III (119мг) і диметилформамід (90мл), а потім суміш перемішують до розчинення. До суміші додають при перемішуванні 2-етокси-1(2H)-хінолінкарбонову кислоту (4,0г) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. До реакційного розчину при перемішуванні додають етанол (720мл), а потім при перемішуванні по краплях - 3M розсіл (1,8мл). Осад збирають центрифугуванням і розчиняють у воді (200мл), при цьому значення рН розчину доводять до величини 7 за допомогою 0,2N водного розчину гідроксиду натрію. Розчин виливають при перемішуванні в етанол (800мл) і до нього додають при перемішуванні по краплях 3M розсіл (4мл). Одержаний осад відокремлюють центрифугуванням і очищують тим самим способом, як й у розділі Препарат 1-(3), що дає цільову сполуку (600мг) у вигляді порошку білого кольору. Вміст активної речовини: 2,4% (УФ спосіб, $\lambda=276\text{нм}$).

Препарат 3

Одержання CM-декстран-2'-O-фенілаланіл-гліцил-таксолу:



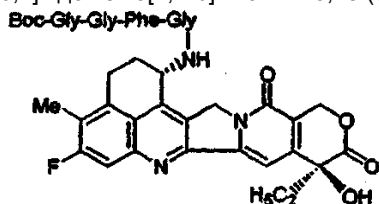
CM-декстран (1,294г, CM-ступінь: 0,47, середня молекулярна вага 170кДа) розчиняють при перемішуванні в очищеній воді (70мл), а потім туди додають мезилат 2'-O-феніл-аланіл-гліцилтаксолу (77мг) і диметилформамід (70мл), і суміш перемішують до розчинення. До суміші при перемішуванні додають 2-етокси-1(2H)-хінолінкарбонову кислоту (2,59г), після чого проводять реакцію при перемішуванні протягом ночі. Реакційний розчин додають до етанолу (700мл) при перемішуванні і туди ж при перемішуванні додають по краплях 3M розсіл (1,4мл). Осад відокремлюють центрифугуванням, розчиняють у воді (240мл) і змішують з етанолом (1200мл) при перемішуванні. До суміші

при перемішуванні додають по краплях 3М розсіл (4,8мл) для осадження. Тим самим способом осадження повторюють тричі, що дає цільовий продукт (746мг) у вигляді порошку білого кольору. Вміст активної речовини 4,8% (УФ спосіб ($\gamma=273\text{нм}$)).

Препарат 4

Одержання карбоксиметилдекстран-поліспирт- (1S,9S)-1-(гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]-індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H, 15H)-діону:

(1) Одержання (1S,9S)-1-(трет-бутоксикарбоніл-гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13 (9H,15H)-діону:

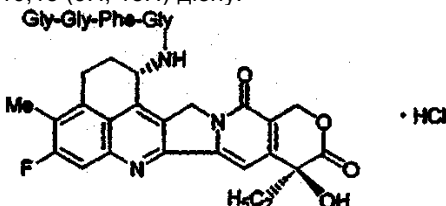


До розчину гідрохлориду (1S,9S)-1-аміно-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діону (167мг; 0,354ммоль), трет-бутоксикарбоніл-гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліцину (463мг; 1,06ммоль) і моногідрату 1-гідроксибензотриазолу (НОВТ) (143мг; 1,06ммоль) у диметилформаміді (ДМФА) (10мл) додають гідрохлорид 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду (EDC) (270мг; 1,42ммоль), триетиламін (148мкл; 1,06ммоль) і 4-диметиламіношридин (DMAP) (5мг; 0,04ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 15 годин і розчинник концентрують при пониженому тиску. Осад розчиняють у хлороформі і суміш промивають, висушують, а розчинник випаровують при пониженому тиску. Осад очищують за допомогою колоночної хроматографії на силікагелі (розчинник-хлороформ: метанол = від 50:1 до 10:1), що дає зазначену сполуку (228мг; вихід 75%) у вигляді твердої речовини блідо-жовтого кольору.

ІЧ (Nujol); 3290,1710, 1655 см^{-1}

ESI-MS; 854 (M+H).

(2) Одержання (1S,9S)-1-(гліцил-гліцил-L-феніл-аланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13 (9H, 15H)-діону:



До розчину (1S,9S)-1-(трет-бутоксикарбоніл-гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діону (220мг; 0,258ммоль) в діоксані

(4мл) додають 4N розчин хлористого водню в діоксані (6мл) при перемішуванні у крижаній бані. Суміш продовжують перемішувати при кімнатній температурі протягом 16 годин. До реакційної суміші додають діетиловий ефір (30мл) і суміш знов перемішують при кімнатній температурі протягом години. Осад збирають фільтруванням і висушують, що дає названу сполуку (176мг; вихід 86%) у вигляді порошку жовтого кольору.

ІЧ (Nujol); 3250, 1745,1660, 1605,1535 см^{-1}

ESI-MS; 754 (M+H).

(3) Одержання декстрану поліспирту (РА-Декстран):

Ацетатний буфер (0,1M, pH5,5, 1000мл) поміщають у тригорлу круглодонну колбу (місткістю 3 літри). Декстран Т-500® (10,0г, фірми Amersham Pharmacia Biotech AB) додають незначними порціями до буфера, зазначеного вище, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Суміш перемішують приблизно 30 хвилин, доки розчин не стане прозорим, а потім суміш охолоджують при температурі 5°C (температура всередині) в бані.

Окремо у колбу (місткістю 1 літр) додають періодат натрію (33,0г) і воду (1000мл) і суміш перемішують при кімнатній температурі, а потім охолоджують при температурі 5°C.

До зазначеного вище розчину декстрану додають при перемішуванні зазначений вище розчин періодату натрію при температурі 5°C, і суміш залишають при температурі 5°C протягом 5 днів у темному місці. Надлишок періодату натрію видаляють за допомогою додання етиленгліколю (10мл), після чого суміш додатково перемішують при температурі 5°C протягом 2 годин. Реакційну суміш охолоджують до температури 3°C і до неї додають 8М водний розчин гідроксиду натрію, при цьому температуру реакції підтримують нижче 6°C (поки значення pH реакційної суміші не стане вище pH, що дорівнює 9). Потім до реакційної суміші додають боргідрид натрію (14г) незначними порціями при перемішуванні, після чого суміш перемішують при температурі 5°C протягом ночі. Для того, щоб видалити надлишок боргідриду натрію, значення pH реакційної суміші знижують до pH нижче 5,5 шляхом додання до неї оцтової кислоти при температурі від 3 до 6°C, і суміш потім перемішують протягом ще 2 годин. Значення pH реакційної суміші доводять приблизно до 7,8 за допомогою 8М водного розчину гідроксиду натрію. Суміш піддають діалізу проти води (мембрана Spectra®/Por 3, межа виключення за молекулярною вагою <3500) і ліофілізації, що дає декстран поліспирт (8,34г) у вигляді аморфного порошку.

(4) Одержання карбоксиметилдекстрану поліспирту (CM-РА-Декстран):

Воду (155мл) поміщають у тригорлу кругл о донну колбу (місткістю 500мл) і до неї додають при перемішуванні декстран поліспирт (5,18г) при кімнатній температурі протягом понад 10 хвилин. Суміш перемішують приблизно від 10 до 30 хвилин, поки вона не стане прозорою, а потім до розчину декстрану поліспирту при перемішуванні незначними порціями додають гідроксид натрію (у гранулах, 97,0%, 21,8г), при цьому температуру всередині підтримують на рівні від 30 до 40°C на крижаній бані. Колбу з реакційною сумішшю помі-

щують на бані і суміш перемішують при температурі 30°C. При перемішуванні незначними порціями додають монохлороцтову кислоту (31,1г) в реакційну суміш при температурі від 30 до 40°C. Після завершення додавання суміш перемішують при температурі 30°C в бані протягом 20 годин. Потім реакційну суміш охолоджують в бані з льодом і нейтралізують, додаючи оцтову кислоту при перемішуванні (тобто, значення рН доводять до величини нижче 9).

До суміші додають воду (160мл) і піддають діалізу проти води (мембрана Spectora®/Por 3, межа виключення за молекулярною вагою <3500) і ліофілізації, що дає карбоксиметилдекстран поліспирт (6,53г) у вигляді аморфного порошку.

(5) Одержання карбоксиметилдекстран поліспирт-(1S,9S)-1-(гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діону:

Воду (40мл) поміщають у кругло донну колбу (місткістю 100мл) і до неї додають карбоксиметилдекстран поліспирт (1,0г) при кімнатній температурі при перемішуванні протягом 5 хвилин. Потім суміш перемішують близько 30 хвилин, поки суміш не стане прозорою. До суміші додають при перемішуванні розчин (1S,9S)-1-(гліцил-гліцил-L-фенілаланіл-гліциламіно)-9-етил-5-фтор-2,3-дигідро-9-гідрокси-4-метил-1H,12H-бензо[de]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-b]хінолін-10,13(9H,15H)-діону у диметилформаміді (100мг/10мл) і потім диметилформамід (15мл), після цього суміш перемішують ще 10 хвилин. До суміші додають по краплях при перемішуванні ро-

зчин 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохіноліну (EEDQ) у диметилформаміді (1,0г/10мл) при кімнатній температурі і суміш додатково перемішують протягом 18 годин. Реакційну суміш піддають діалізу (мембрана Spectora®/Por 3, межа виключення за молекулярною вагою <3500), і потім очищують за допомогою катіонообмінної колонки (колонка BioRad AG® MP-50, Na-форма, 30мл). Основну фракцію піддають діалізу (мембрана Spectora®/Por 3, межа виключення за молекулярною вагою <3500) і ліофілізації, що дає сирий продукт, який розтирають з ацетоном, збирають фільтруванням і висушують з одержанням цільового продукту (904мг) у вигляді порошку біло-жовтого кольору.

Промислова застосовність

Фармацевтична композиція за даним винаходом може у високому ступені накопичуватися у такому місці, як лімфатичний вузол або печінка, на які може поширюватися ракова пухлина, і діяти пригнічувально на зростання ракових клітин, не діючи при цьому на нормальні клітини і, отже, фармацевтична композиція даного винаходу корисна для інгібування метастазів, особливо для інгібування метастазів лімфатичного вузла чи метастазів печінки, або для запобігання рецидиву злоякісної пухлини.

Крім того, дана фармацевтична композиція може демонструвати свою дію не тільки перед початком утворення метастазів, але також й після того, як вони утворилися. Таким чином, дана фармацевтична композиція також корисна для інгібування метастазів або запобігання рецидиву злоякісної пухлини після місцевої терапії (наприклад, хірургії, променевої терапії, термотерапії, кріотерапії, лазерноспалювальної терапії і т.д.).

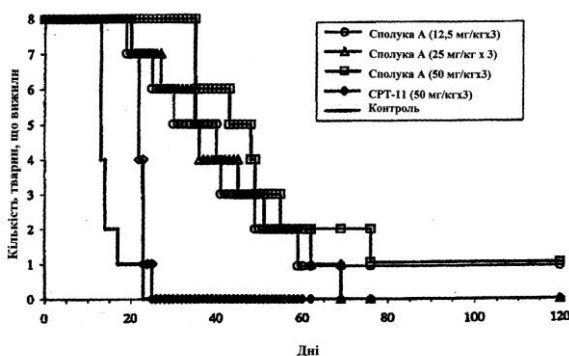


Fig.1