



УКРАЇНА

(19) UA (11) 79480 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/424

C07D 498/18 (2007.01)

C07D 498/22 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ, ЩО МІСТИТЬ ДИЗОРАЗОЛИ ТА ЇХ ПОХІДНІ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДОБРОЯКІСНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) а200501355

(22) 22.08.2003

(24) 25.06.2007

(86) PCT/EP2003/009329, 22.08.2003

(31) 60/405,594

(32) 24.08.2002

(33) US

(46) 25.06.2007, Бюл. № 9, 2007 р.

(72) Ірчік Герберт, DE, Янсен Рольф, DE, Сасе Флоренц, DE, Бааснер Сільке, DE, Шмідт Петер, DE, Гюнтер Екхард, DE

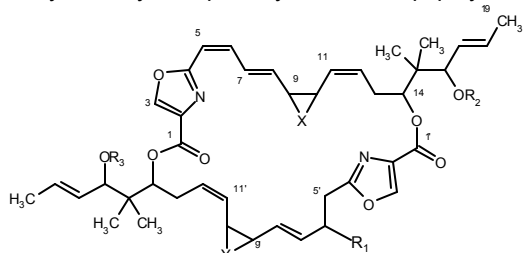
(73) ЦЕНТАРІС ГМБХ, DE

(56) HILLIER, M.C. et al: "Studies on the Total Synthesis of Disorazole C1. An Advanced Macrocyclic Intermediate" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (2001), 66(18), 6037-6045, XP002265586

JANSEN, ROLF et al: "Antibiotics from gliding bacteria. LIX. Disorazoles, highly cytotoxic metabolites from the sorangicin-producing bacterium Sorangium cellulosum, strain So œ12" LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE (1994), (8), 759-73, XP002265587 cited in the application the whole document

DATABASE BIOSIS "Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 IRSCHIK HERBERT ET AL: "Disorazole A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from mycobacteria" Database accession no. PREV199598168308 XP002265588 cited in the application abstract & JOURNAL OF ANTIBIOTICS (TOKYO), vol. 48, no. 1, 1995, pages 31-35, ISSN: 0021-8820 the whole document.

(57) 1. Лікарський засіб, який містить принаймні одну похідну дизоразолу загальної формули I



Формула I

у якій, незалежно одне від одного

R₁ є:

(i) воднем,

(ii) OR₄,

(iii) частиною подвійного зв'язку з C5',

R₂, R₃ та R₄ є:

(i) воднем,

(ii) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₆)-алкілом,(iii) (C₁-C₄)-алкілом, заміщеним одним або кількома атомами фтору, в оптимальному варіанті - трифторометильною групою,(iv) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкіл-(C₆-C₁₄)-арилом, незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкілгетероарилом,(v) (C₁-C₄)-алкоксикарбонілом, (C₁-C₄)-алкіламінокарбоніл,алкіламінотіокарбонілом, (C₁-C₆)-алкілкарбонілом або (C₁-C₆)-алкоксикарбоніл-(C₁-C₆)-алкілом,причому є можливим заміщення алкільного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, NH-(C₃-C₁₂)-циклоалкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками, і також можливим є заміщення арильного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом та/або (C₃-C₈)-гетероциклілом, що має від 1 до 5 гетероатомів, в оптимальному варіанті - азоту, кисню, сірки, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками, іX, Y є: у кожному з випадків окремо незалежно одне від одного або разом киснем, сіркою, двома сусідніми гідроксильними групами, двома сусідніми метоксигрупами, частиною подвійного зв'язку, причому виключається сполука, в якій R₁ є метокси, R₂, R₃ є воднем, X є киснем, і Y є частиною подвійного зв'язку,

її тауомери, E/Z ізомери, стереоізомери, включаючи діастереомери та енантіомери, та її фізіологічно прийнятні солі.

2. Лікарський засіб за п. 1, який містить похідну дизоразолу та фармацевтично прийнятні носії та/або розріджувачі й наповнювачі у формі розчи-

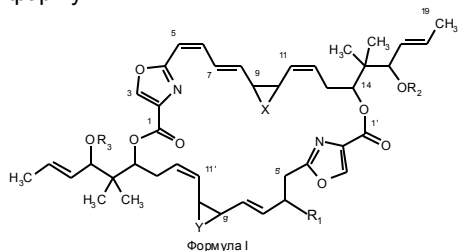
(13) C2

(11) 79480

(19) UA

нів, суспензій, емульсій, пін, мазей, паст, пластирів або імплантатів для введення.

3. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I



у яких, незалежно одне від одного

R₁ є:

(i) воднем,

(ii) OR₄,

(iii) частиною подвійного зв'язку з C5',

R₂, R₃ та R₄ є:

(i) воднем,

(ii) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₆)-алкілом,

(iii) (C₁-C₄)-алкілом, заміщеним одним або кількома атомами фтору, в оптимальному варіанті - трифторометильною групою,

(iv) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкіл-(C₆-C₁₄)-арилом, незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкілгетероарилом,

(v) (C₁-C₄)-алкоксикарбонілом, (C₁-C₄)-алкіламінокарбонілом, (C₁-C₄)-алкіламінотіокарбонілом, (C₁-C₆)-алкілкарбонілом або (C₁-C₆)-алкоксикарбоніл-(C₁-C₆)-алкілом,

причому є можливим заміщення алкільного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, NH-(C₃-C₁₂)-циклоалкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками, і також можливим є заміщення арильного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом та/або (C₃-C₈)-гетероциклілом, що має від 1 до 5 гетероатомів, в оптимальному варіанті - азоту, кисню, сірки, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками, і

X, Y є: у кожному з випадків окремо незалежно одне від одного або разом киснем, сіркою, двома сусідніми гідроксильними групами, двома сусідніми метоксигрупами, частиною подвійного зв'язку, причому виключається сполука, в якій R₁ є метокси, R₂, R₃ є воднем, X є киснем, і Y є частиною подвійного зв'язку,

їх таутомерів, E/Z ізомерів, стереоізомерів, включаючи діастереомери та енантіомери, та їх фізіологічно прийнятних солей, для виготовлення медикаменту для лікування доброякісних або злоякісних онкозів у людей або тварин.

4. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I за п. 3 для лікування онкозів, окремо або в комбінації з цитотоксичними речовинами та/або інгібіторами трансдукції сигналу.

5. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I для виготовлення медикаменту для лікування захворювань у людей або тварин, в основі яких лежить швидка й неконтрольована проліферація ендокринних клітин.

6. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I для виготовлення медикаменту для лікування захворювань, які реагують на імуномодуючу дію, таких як псоріаз, артеріосклероз, артрит, кератоз, розсіяний склероз та рак.

7. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I для виготовлення медикаменту для лікування інфекційних захворювань, таких як кахексія, малярія, СНІД і пов'язана з інфекцією лихоманка та біль.

8. Застосування похідних дизоразолу загальної формули I для виготовлення медикаменту для лікування запальних та алергічних захворювань, запалень, опосередкованих еозинофілами, або проліферативних захворювань, таких як захворювання дихальних шляхів, бронхіальна астма, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, екзема та хвороба Крона.

9. Застосування похідної дизоразолу E1 загальної формули I, у якій R₁ та R₂ є воднем, R₃ є метилом, і X та Y є киснем, за п. 3, для виготовлення медикаменту для лікування доброякісних або злоякісних онкозів у людини або тварин.

10. Застосування похідної дизоразолу загальної формули I за п. 9 для виготовлення медикаменту для лікування раку молочної залози, раку яєчника, раку легень, раку шкіри, раку передміхурової залози, раку нирок, раку печінки, раку підшлункової залози, раку товстої кишки та ракових захворювань головного мозку у людей.

11. Застосування похідної дизоразолу загальної формули I за пп. 9 або 10 для виготовлення медикаменту для лікування доброякісних або злоякісних онкозів у людей або тварин у комбінації з іншими протипухлинними засобами.

12. Застосування похідної дизоразолу загальної формули I за будь-яким з пп. 3 по 11 для виготовлення медикаменту для лікування доброякісних або злоякісних онкозів у людей або тварин у комбінації з паклітакселом, доцетакселом, вінкристином, віндезином, цисплатином, карбоплатином, доксорубіцином, іфосфамідом, циклофосфамідом, 5-FU, метотрексатом або в комбінації з імуномодуляторами або антитілами, зокрема, в комбінації з інгібіторами трансдукції сигналу, такими як Herceptin, Glivec або Iressa та іншими.

У наступні кілька років очікується різке збільшення онкозів та пов'язаних з пухлинами смертних випадків у всьому світі. У 2001 році в усьому світі приблизно 10 мільйонів людей страждали від раку,

і понад 6 мільйонів людей померли від цього захворювання. Розвиток пухлин є основним захворюванням вищих організмів у рослинному світі, у тваринному світі та серед людей. Існує загально-

відоме припущення, що багатоступінчаста модель карциногенезу полягає в тому, що в результаті накопичення кількості мутацій в окремій клітині вона змінюється у своїй проліферації та диференціації таким чином, що зрештою, через доброякісні проміжні стадії, це призводить до злоякісного стану з метастазами. Термін "рак" або "пухлина" не розкриває клінічної картини з понад 200 різними окремими захворюваннями. Онкози можуть розвиватися доброякісно або злоякісно. Найбільш значними пухлинами є пухлини легенів, молочної залози, шлунка, шийки матки, передміхурової залози, голови та шиї, великого та малого кишечника, печінки та кровоносної системи. Існують великі розбіжності щодо курсу, прогнозування та терапії. Понад 90% розпізнаних випадків стосуються твердих пухлин, які, особливо на пізній стадії або в разі метастазів, є важковиліковними або взагалі невиліковними. Три основні принципи боротьби з раковими захворюваннями й досі полягають у хірургічному видаленні, опроміненні та хіміотерапії. Незважаючи на значний прогрес, досі нікому не вдавалося розробити медикаменти, які забезпечують помітне подовження тривалості життя або навіть повне виліковування поширених твердих пухлин. Таким чином, велике значення має винайдення нових медикаментів для боротьби з раком.

Даний винахід стосується дизоразолу - за винятком дизоразолу A1 - та похідних дизоразолів і їх застосування як медикаментів, зокрема, для лікування доброякісних та злоякісних пухлин у людей та ссавців.

Несподівано було виявлено, що дизоразолі E1 та D1, зокрема, мають відмінний цитотоксичний вплив на різні клітинні лінії пухлин людини. У нано- та пікомолярних концентраціях інгібується, крім інших, поділ клітин карциноми яєчника, карциноми передміхурової залози, гліобластоми, карциноми легенів та раку молочної залози клітини. Дія дизоразолів E1 та D1 у цьому разі залежить від клітинного циклу, і навіть у наномолярних концентраціях клітинний цикл тримається у фазі G2/M, і це викликає апоптоз ракових клітин. Крім того, це дозволяє продемонструвати, що в основі заявленої антипроліферативної дії дизоразолів, серед іншого, лежить ефективне інгібування полімеризації тубуліну. Дизоразол E1, зокрема, також має високу активність проти резистентних до паклітакселу та віндезину клітинних ліній. Винахід дозволив продемонструвати, що дизоразол E1 є високоефективним щодо біологічної дії, і, таким чином, може бути застосований як активна сполука у медикаменті для боротьби з раковими захворюваннями.

Це має значення, зокрема, через те, що дизоразол A1 є непридатним для застосування як цитостатик [G. Hoefle, annual report 1999/2000 of the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung [Association for Biotechnological Research] GBF, p.103].

Однак, у терапевтичному експерименті з використанням, крім інших, наприклад, мишей без вилочкової залози з ксенотрансплантатом пухлини NCI-H460, при внутрішньовенному введенні дизоразолу E1 можна було спостерігати значне зниження росту пухлин навіть у дозах, які не забезпечували зниження маси або навіть призводили до

смертності.

Природні речовини є важливим джерелом нових структур у фармацевтичних дослідженнях і у деяких випадках також є безпосередньо придатними для розробки нових медикаментів [Y.-Z. Shu, J. Nat. Prod., 1998. 61, 1053-1071]. Відомо, що багато природних речовин мають сильний цитотоксичний вплив [V. J. Ram, S. Kumari, DNP, 2001, 14(8), 465-482].

Відомо, що природні речовини з групи, яка складається з дизоразолів, виділяють із бактерії штаму *Sorangium cellulosum* So œ12 [R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Hofle, Liebig's Ann. Chem., 1994. (8), 759-773]. Загалом було виділено й охарактеризовано з фізико-хімічної точки зору 29 дизоразолів. Про дизоразол A1 повідомляється, що він має антипроліферативну дію у клітинних моделях [H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Hofle, H. Reichenbach, J. Antibiot. 1995. 48(1), 31-35; Y. A. Elnakady, Dissertation, Brunswick Technical University, 2001]. Однак, немає ні опису, ані згадки про застосування для лікування онкозів. Біологічне дослідження інших дизоразолів не здійснювалося.

Сполуки згідно з винаходом є придатними, крім іншого, без обмежень, для застосування як медикаментів для лікування доброякісних та злоякісних онкозів або інших антипроліферативних порушень у людини та тварин. В принципі, сполуки згідно з винаходом є придатними для контролю над усіма порушенням, в основі яких лежить неконтрольований і швидкий поділ клітин, і які, таким чином, викликають виникнення патологічних станів. Сполуки згідно з винаходом застосовують як окремі речовини або в комбінації з іншими цитотоксичними речовинами, наприклад, цисплатином, карбоплатином, доксорубіцином, іфосфамідом, циклофосфамідом, 5-FU, метотрексатом, зокрема, в комбінації з інгібіторами трансдукції сигналу, такими як, наприклад, Herceptin, Glivec або Iressa, а також деякими іншими.

Синтетичні та напівсинтетичні аналоги дизоразолів також мають антипроліферативну дію. За допомогою спеціальної модифікації форми молекули можна модулювати важливі властивості, такі як біологічна інгібіторна дія, стійкість та біофізичні властивості. Таким способом можна одержувати цінні з терапевтичної точки зору похідні вихідних сполук. Інша мета дериватизації полягає в послабленні можливих токсичних побічних ефектів.

Сполуки згідно з винаходом вводять як рідкі фармацевтичні форми. Введення здійснюють способом, який є придатним, залежно від конкретного випадку, у формі розчинів або суспензій.

Сполуки згідно з винаходом вводять у придатній для введення формі, в оптимальному варіанті - в артерію, внутрішньоартеріально у формі ін'єкції; у вену, внутрішньовенно у формі ін'єкції або інфузії; у шкіру, внутрішньошкірно у формі ін'єкції; під шкіру, підшкірно у формі ін'єкції; у м'язи, внутрішньом'язово у формі ін'єкції; у черевну порожнину, внутрішньочеревинно у формі ін'єкції або інфузії.

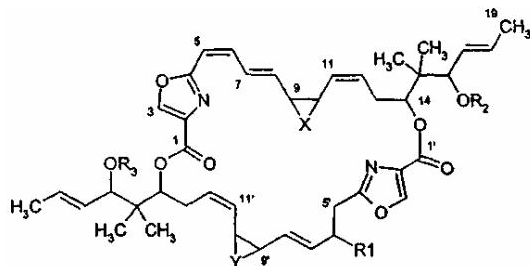
Якщо сполуки загальної формули I згідно з винаходом мають принаймні один асиметричний центр, вони можуть існувати у формі їх рацематів, у формі чистих енантімерів та/або діастереомерів.

рів, або у формі сумішей цих енантіомерів та/або діастереомерів, тобто і як речовини, і як фармацевтично прийнятні солі цих сполук. Суміші можуть бути в будь-якому потрібному співвідношенні стереоізомерів.

Якщо потрібно, конфігурації кожного з подвійних зв'язків у сполуках згідно з винаходом незалежно одне від одного в кожному з випадків можуть бути E або Z.

Якщо можливо, сполуки згідно з винаходом можуть бути у формі таутомерів.

Згідно з одним варіантом втілення винахід стосується сполук загальної формули I:



Формула I

у яких, незалежно одне від одного

R1 є:

(i) воднем

(ii) OR4

(iii) частиною подвійного зв'язку з C5'

R2, R3 та R4 є:

(i) воднем

(ii) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₆)-алкілом,

(iii) (C₁-C₄)-алкілом, заміщеним одним або кількома атомами фтору, в оптимальному варіанті - трифторометильною групою,

(iv) незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкіл-(C₆-C₁₄)-арилом, незаміщеним або заміщеним (C₁-C₄)-алкілгетероарилом,

(v) (C₁-C₄)-алкоксикарбонілом, (C₁-C₄)-алкіламінокарбонілом, (C₁-C₄)-алкіламінотіокарбонілом, (C₁-C₆)-алкілкарбонілом або (C₁-C₆)-алкоксикарбоніл-(C₁-C₆)-алкілом,

причому є можливим заміщення алкільного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, NH-(C₃-C₁₂)-циклоалкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками, і також можливим є заміщення арильного радикала F, Cl, Br, I, CN, NH₂, NH-(C₁-C₂₀)-алкілом, OH, O-(C₁-C₂₀)-алкілом та/або (C₃-C₈)-гетероциклілом, що має від 1 до 5 гетероатомів, в оптимальному варіанті - азоту, кисню, сірки, одноразово або, на однакових або різних атомах, багаторазово, однаковими або різними замісниками,

i

X, Y є: у кожному з випадків окремо незалежно одне від одного або разом киснем, сіркою, двома сусідніми гідроксильними групами, двома сусідніми метокси-групами, частиною подвійного зв'язку,

причому виключається сполука, в якій R1 є метокси, R2, R3 є воднем, X є киснем, і Y є частиною подвійного зв'язку.

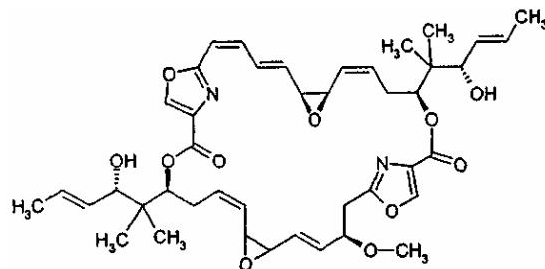
Вираз "арил" з точки зору даного винаходу

означає ароматичні вуглеводні, до яких, крім інших, належать феноли, нафтили та антраценіли. Радикали також можуть бути злиті з іншими насиченими, (частково) ненасиченими або ароматичними кільцевими системами.

Вираз "гетероарил" означає 5-, 6- або 7-членний циклічний ароматичний радикал, який містить принаймні 1, необов'язково також 2, 3, 4 або 5 гетероатомів, причому гетероатоми є однаковими або різними. Гетероцикл також може бути частиною бі- або поліциклічної системи. Оптимальними гетероатомами є азот, кисень та сірка. В оптимальному варіанті гетероарильний радикал вибирають із групи, яка включає піроліл, фурил, тієніл, тiazоліл, оксазоліл, ізоксазоліл, піразоліл, імідазоліл, піридиніл, шримідиніл, піразиніл, індолил, індолізиніл, хінолініл, ізохінолініл, хіназолініл, хіноксалініл, карбазоліл, феназиніл, фенотіазиніл, акридиніл.

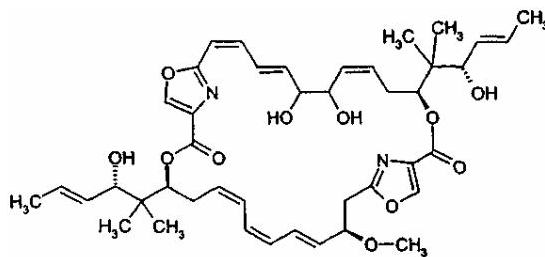
Найбільшу перевагу віддають сполукам згідно з загальною формулою I, які трапляються в такій групі.

(1) Дизоразол E1



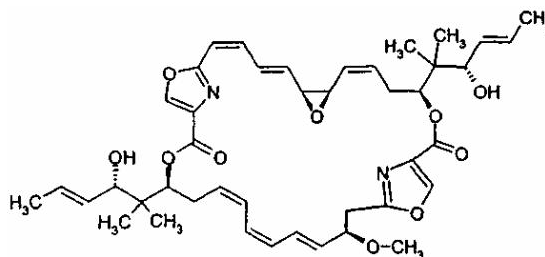
Формула II: дизоразол E1

(2) Дизоразол D1



Формула III: дизоразол D1

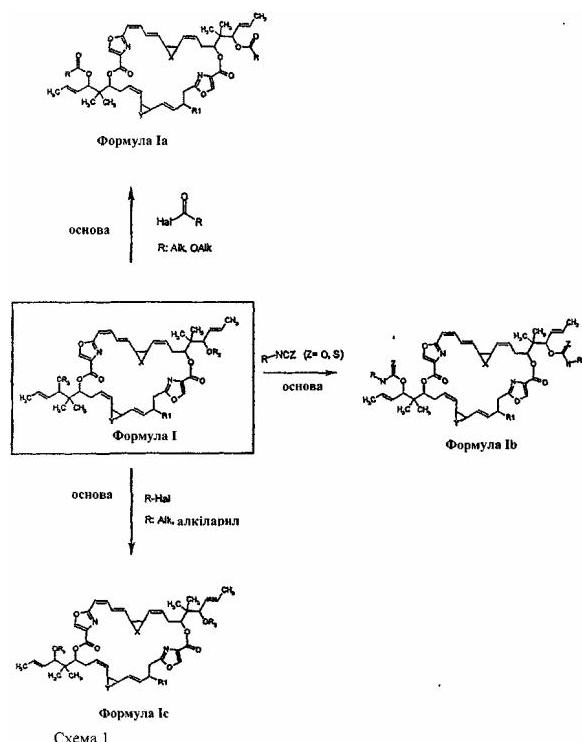
(3) Спеціально зазначено, що дизоразол A1 не є предметом даного винаходу.



Формула IV: дизоразол A1

Синтетичні та напівсинтетичні аналоги дизо-

разолів загальної формули Ia, Ib та Ic згідно з даним винаходом одержують за схемою 1:



Дизоразоли загальної формули I традиційним способом можуть бути перетворені на похідні, які є предметом даного винаходу, згідно з формулою Ia, Ib та Ic, шляхом заміщення водню на R2, R3 та R4.

Наприклад, якщо треба одержати заміщені дизоразоли згідно з формулою Ic, у яких R2, R3 та R4 = алкіл або алкіларил, то відповідний дизоразол загальної формули I піддають реакції з відповідним алкілюючим галідом або алкіларилгалідом та відповідною основою, в оптимальному варіанті - триетиламіном, піридином, металоалкоголятом, гідридом натрію або карбонатом калію, у відповідному розчиннику, наприклад, дихлорометані, діетиловому етері, ацетонітрилі, NN-диметилформаміді, при температурі від 0 до 100°C [J. Org. Chem. 1971, 36, 284-294].

Наприклад, якщо треба одержати заміщені дизоразоли згідно з формулою Ib, у яких R2, R3 та R4 = карбамат, тіокарбамат, то відповідний дизоразол загальної формули I піддають реакції з відповідними ізоціанатами або ізотіоціанатами у присутності відповідної основи, в оптимальному варіанті - триетиламіну, піридину, гідриду натрію, металоалкоголяту, NaOH у воді або карбонату калію, і у відповідному розчиннику, наприклад, дихлорометані, діетиловому етері, ацетонітрилі, NN-диметилформаміді, або сумішах розчинників, таких як суміші діоксан-вода або THF-вода, при температурі від 0 до 100°C [DE2040175. Roczn. Chem. 1972, 46, 717; Tetrahedron Lett. 1993, 34, 3745].

Або, якщо треба одержати заміщені дизоразоли згідно з формулою Ia, у яких R2, R3 та R4 = алкілкарбоніл або алкоксикарбоніл, то відповідний дизоразол загальної формули I піддають реакції з

відповідними алкілкарбонілхлоридами, алкілкарбоніновими ангідридами або хлороформатами у присутності відповідної основи, в оптимальному варіанті - триетиламіну, піридину, гідриду натрію, металоалкоголяту, NaOH у воді або карбонату калію, і у відповідному розчиннику, наприклад, дихлорометані, діетиловому етері, ацетонітрилі, NN-диметилформаміді, або сумішах розчинників, таких як суміші діоксан-вода або THF-вода, при температурі від 0 до 100°C [J. Org. Chem. 1957, 22, 1551; Synth. Commun. 1997, 27, 2777; J. Org. Chem. 1959, 24, 774].

Більш детально винахід пояснюється за допомогою представлених нижче прикладів, які не обмежують його обсягу.

Приклади

Можливості застосування

Приклад 1

Дизоразоли, такі як, наприклад, дизоразол E1, є оптимальними активними сполуками у готових медикаментах для лікування злоякісних онкозів, таких як рак молочної залози, рак легенів, рак яєчника, рак шкіри, рак передміхурової залози, рак товстої кишки, пієлонефроз, рак печінки, рак підшлункової залози та ракові захворювання головного мозку.

В оптимальній формі для введення активна сполука передбачається як ліофілізат разом з наповнювачами, відомими спеціалістам у даній галузі, в ін'єкційній пляшці, і її розчиняють, застосовуючи фізіологічний розчин перед використанням, потім розводять в ін'єкційному резервуарі і вводять пацієнтові за допомогою канюли у вену. Доза, яка залежить від стадії онкозу та стану здоров'я пацієнта, становить від 0,1мг до 100мг активної сполуки на м². Період інфузії залежить від об'єктивних критеріїв захворювання.

Приклад 2

Застосування дизоразолів, таких як, наприклад, дизоразол E1, як активних сполук у готових медикаментах для лікування запальних захворювань. До них належать, наприклад, запальні захворювання дихальних шляхів, такі як бронхіальна астма, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, атопічний дерматит, екзема, алергічний ангіт, запалення, опосередковані еозинофілами, такими як еозинофільна пневмонія та синдром PIE (легеневого інфільтрату з еозинофілією), кропивня, лихоманка, виразковий коліт, хвороба Крона та проліферативні захворювання шкіри, такі як псоріаз та кератоз.

Приклад 3

Застосування дизоразолів таких як, наприклад, дизоразол E1, як активних сполук у готових медикаментах, які мають імуномодулюючу дію, для лікування імунних та аутоімунних захворювань. До таких захворювань можуть належати, наприклад, запалення суглобів, такі як артрит та ревматоїдний артрит та інші артритичні захворювання, такі як ревматоїдний спондиліт та остеоартрит. Інші можливості застосування полягають у лікуванні пацієнтів, які страждають від сепсису, септичного шоку, грам-негативного сепсису, синдрому токсичного шоку, синдрому дихальної недостатності, астми та інших хронічних легеневих захворювань, захворювань резорбції кісток або

реакцій відторгнення трансплантатів або інших аутоімунних захворювань, таких як червоний вовчак, розсіяний склероз, гломерулонефрит та увеїт, інсулінозалежний цукровий діабет та хронічна демієлінізація.

Приклад 4

Застосування дизоразолів, таких як, наприклад, дизоразол E1, як активних сполук у готових медикаментах, які можуть бути застосовані для терапевтичного лікування інфекцій, таких як вірусні інфекції та паразитичні інфекції, наприклад, для терапевтичного лікування малярії, пов'язаної з інфекцією лихоманки, пов'язаною з інфекцією м'язового болю, ВІЛ-інфекції (СНІД) та кахексії.

Виготовлення

Для введення сполук згідно з винаходом перевагу віддають композиціям, призначеним для парентерального, кризьшкірного, локального, інгаляційного та інтраназального введення. Виготовлення, фасування та запечатування композицій здійснюють у традиційних антимікробних і антисептичних умовах.

Додатково до принаймні однієї складової згідно з винаходом фармацевтичні форми, залежно від застосовуваної фармацевтичної форми, необов'язково містять наповнювачі, до яких, крім інших, належать, розчинники, прискорювачі розчинення, солюбілізатори, емульгатори, зволожуючі засоби, протиспінювачі, гелеутворювальні агенти, загусники, буфери, солетворні агенти, консерванти, антиоксиданти, барвники, речовини для корекції смаку та запаху. Вибір наповнювачів, які мають бути застосовані, та їх кількість залежить від вибраної фармацевтичної форми і пристосовується до композицій, відомих спеціалістам у даній галузі.

Медикаменти згідно з винаходом вводять у формі, придатній для введення у шкіру, кризьшкірно у формі розчину, суспензії, емульсії, піни, мазі, пасти або пластиру; через слизову оболонку носа, назально у формі крапель, мазі або аерозолі; через бронхіальний та альвеолярний епітелій, пульмонально або шляхом інгаляції у формі аерозолі або інгалятора; через кон'юнктиву, кон'юнктивально у формі очних крапель, очної мазі, очних таблеток, ламел або очних примочок; в артерію, внутрішньоартеріально у формі ін'єкції; у вену, внутрішньовенно у формі ін'єкції або інфузії, навколоренно у формі ін'єкції або інфузії; у шкіру, внутрішньошкірно у формі ін'єкції або імплантату; під шкіру, підшкірно у формі ін'єкції або імплантату; у м'язи, внутрішньом'язово у формі ін'єкції або імплантату; у черевну порожнину, внутрішньочеревинно у формі ін'єкції або інфузії.

У протипухлинній терапії сполуки загальної формули I згідно з винаходом застосовують як

окремні речовини або в комбінації з іншими цитотоксичними речовинами, такими як, наприклад, паклітаксел, доцетаксел, вінкристин, віндезин, цисплатин, карбоплатин, доксорубіцин, іфосфамід, циклофосфамід, 5-FU, метотрексат, або в комбінації з імуномодуляторами або антитілами, зокрема, в комбінації з інгібіторами трансдукції сигналу, такими як, наприклад, Herceptin, Glivec або Iressa.

Приклад 5

Композиції для парентерального введення дизоразолів, таких як, наприклад, дизоразол E1, можуть бути у формі окремих дозованих одиниць, таких як, наприклад, ампули або флакони. В оптимальному варіанті застосовують розчини активної сполуки, в оптимальному варіанті - водні розчини, зокрема, ізотонічні розчини або, в альтернативному варіанті - суспензії. Ці ін'єкційні форми роблять доступними як готові до вживання композиції або приготують лише безпосередньо перед використанням шляхом змішування активної сполуки, наприклад, ліофілізату, у відповідному разі, з іншими твердими носіями, з потрібним розчинником або суспендуєчим агентом.

Приклад 6

Композиції для інтраназального введення дизоразолів, таких як, наприклад, дизоразол E1, можуть бути у формі водних або олійних розчинів або у формі водних або олійних суспензій. Вони також можуть бути у формі ліофілізатів, які приготують перед використанням, застосовуючи відповідний розчинник або суспендуєчий агент.

Біологічна дія сполук згідно з винаходом

Приклад 7 Антипроліферативна дія на різні клітинні лінії пухлин

Сполуки згідно з винаходом досліджували на їх антипроліферативну активність у випробуванні проліферації на старих клітинних лініях пухлин [D.A. Scudiero et al. Cancer Res. 1988, 48, 4827-4833]. Застосоване випробування визначає активність клітинної дегідрогенази й дозволяє визначити життєздатність клітин та, опосередковано, кількість клітин. Клітинними лініями, які використовували для прикладу, були клітинна лінія цервікальної карциноми людини KB/HeLa (ATCC CCL17), клітинна лінія аденокарциноми яєчника SKOV-3 (ATCC HTB77), клітинна лінія гліобластоми людини SF-268 (NCI 503138), клітинна лінія карциноми легенів NCI-H460 (NCI 503473) та клітинна лінія аденокарциноми товстої кишки людини RKOP27.

Цитотоксичну або інгібуючу ріст активність описаних сполук, а також контрольних сполук, показано в таблиці 1. Результати показують дуже ефективне інгібування проліферації вибраної клітинної лінії пухлин речовинами згідно з винаходом.

Таблиця 1

Інгібування проліферації речовинами згідно з винаходом
у ХТТ випробуванні цитотоксичності на клітинних лініях пухлин людини

Приклад	ХТТ аналіз проліферації, EC ₅₀ у [мкг/мл]				
	KB/HeLa	SKOV3	SF-268	NCI-H460	RKOP27
Дизоразол E1	0,00005	0,000016	0,00012	0,00003	0,00006
Дизоразол D1	0,00015	0,0001	0,00022	0,00015	0,0003
Дизоразол A1	0,00015	0,0002	0,00027	0,00015	0,00025
Паклітаксел	0,01	0,01	0,01	0,01	
Віндезин	0,002	0,002	0,005	0,006	

Приклад 8 Антипроліферативна дія на клітинні лінії пухлин MDR

Для подальшої характеристики речовини згідно з винаходом досліджували на резистентних до багатьох медикаментів клітинних лініях (MDR) порівняно з нерезистентними клітинними лініями дикого типу.

Досліджуваними клітинними лініями є клітинна лінія гострої мієлоїдної лейкемії LT12 та резистентна лінія LT12/mdr. Крім того, як випробувальні системи використовували клітинну лінію миші P388 (викликане метилхолантеном лімфоїдне новоутворення) та доксорубіцин-резистентні P388.

Результати у зведеній формі показано нижче в таблиці 2:

Таблиця 2

Інгібіторна дія дизоразолу E1 та контрольних речовин у ХТТ випробуванні проліферації на нерезистентні та резистентні клітинні лінії пухлин

Речовина	ХТТ аналіз проліферації, EC ₅₀ у [мкг/мл]			
	LT12	LT12MDR	P388	P388ADR
Дизоразол E1	0,0001	0,004	0,0004	0,001
Паклітаксел	0,005	0,340	0,035	>3,16
Віндезин	0,0009	0,222	0,009	0,94

Дизоразол E1 демонструє дуже ефективну інгібіторну дію на всі випробувані клітинні лінії, тоді як у випадках з класичними інгібіторами тубуліну, такими як паклітаксел або вінкристин, виявляли значно знижену дію та перехресну резистентність до клітинних ліній MDR1.

Приклад 9 Інгібування полімеризації тубуліну

Речовини випробували в in-vitro випробуванні інгібування полімеризації β -тубуліну великої рогатої худоби [D.M. Bollag et al. Cancer Res. 1995, 55, 2325-2333]. У цьому випробуванні застосовують тубулін, очищений шляхом циклів полімеризації та деполімеризації, і його полімеризують шляхом додавання GTP та нагрівання. Показники EC₅₀ інгібування полімеризації β -тубуліну з 30% зв'язаними білками (MAP) представлено у таблиці 3.

Таблиця 3

Інгібування полімеризації β -тубуліну за допомогою 30% MAP Результати показують, що дизоразол E1 та D1 інгібують полімеризацію тубуліну в низьких концентраціях

Речовини	EC ₅₀ у [мкг/мл] з 30% MAP
Дизоразол E1	1,50
Дизоразол D1	2,50
Дизоразол A1	4,8
Віндезин	0,40

експерименти: n=2

Приклад 10 Аналіз клітинного циклу

Клітинний цикл включає розвиток клітини від однієї генерації клітин до наступної.

Під час спокійної фази (G0) та передсинтетичної фази (G1) клітина має диплоїдний набір хромосом (2c). У фазі синтезу (S) кількість ДНК збільшується шляхом реплікації. S-фаза завершується досягненням премітотичної фази (G2M), у якій клітина має комплемент редульованих хромосом (4c) і подвійний вміст ДНК. У наступній, перехідній фазі мітозу (M) відбувається рівномірний розподіл редульованих хромосом серед двох дочірніх клітин, які потім у кожному з випадків також демонструють вміст диплоїдної ДНК і перебувають у G01-фазі, щоб клітинний цикл міг розпочатися знову.

Для аналізу клітинного циклу клітини KB/HeLa обробляли випробуваними речовинами в різних концентраціях (0,1-1000нМ) протягом 24 годин при 37°C.

Відсоткова пропорція клітин, блокованих у фазі G2/M клітинного циклу після обробки контрольними речовинами або вибраними випробуваними речовинами, показана нижче у таблиці 4. Результати оцінювали, застосовуючи спеціальну програму для аналізу (ModFit™).

Таблиця 4

Концентрація, при якій
50% клітин блокуються у фазі G2/M

Приклад	EC ₅₀ у [нМ] (50% клітин у G2/M)
Дизоразол Е1	1,6
Паклітаксел	46
Віндезин	3,0

Сполуки згідно з винаходом мають найвищу активність порівняно з контрольними сполуками. Зокрема, дизоразол Е1 інгібує клітинний цикл у фазі G2/M при надзвичайно низьких концентраціях.

Приклад 11 In vivo результати

In-vivo активність сполук згідно з винаходом випробували на моделях ксенотрансплантатів у людини та мишей.

У терапевтичному експерименті, який здійснювали на мишах без вилочкової залози з ксенотрансплантатом пухлини NCI-H460, дизоразол Е1, введений внутрішньовенно, забезпечував значне зниження росту пухлини навіть у дозах, які не забезпечують значного зниження маси або навіть

призводять до смертності.

Фігура: експеримент з in-vivo обробкою дизоразолом Е1 ксенотрансплантата пухлини NCI-H460

Модель миші без вилочкової залози

Дизоразол Е1 (D-42805): 0,5мг/кг; внутрішньовенно: день 0, 7; 8 випадків смертності (день 11, 12, 13)

Дизоразол Е1 (D-42805): 0,1мг/кг; внутрішньовенно: день 0, 7, 14; без випадків смертності

Дизоразол Е1 (D-42805): 0,05мг/кг; внутрішньовенно: день 0, 7, 14; без випадків смертності

Контроль: розчин розсолу 0,9% концентрації, який містить 3,3% DMSO, 10мл/кг; n=8 тварин/групу

Приклад 12 AMES-тест (тест на канцерогенність за частотою мутацій)

Для оцінки можливих побічних ефектів дизоразол Е1 досліджували на мутагенність шляхом аналізу коливань на мутантних штаммах TA98 та TA100 бактерії *Salmonella typhimurium* у трьох концентраціях (2,5; 5 та 10мкМ). Дослідження мутагенності далі здійснювали у присутності ферменту печінки щура S9.

Результати показано нижче у таблиці 5:

Таблиця 5

Дослідження дизоразолу Е1 на мутагенність

Сполука	Конц. [мкМ]	AMES TA98 без S9	AMES TA98 з S9	AMES TA100 без S9	AMES TA100 з S9
Дизоразол Е1	10	неактивний	неактивний	неактивний	неактивний
Дизоразол Е1	5	неактивний	неактивний	неактивний	неактивний
Дизоразол Е1	2,5	неактивний	неактивний	неактивний	неактивний

Дизоразол Е1 не виявляє впливу в описаних умовах випробування у вищезазначених концентраціях, і, таким чином, є неактивним у AMES-тесті. Приклад 13 Вплив на біосинтез білка та

непроліферативні клітини

Для оцінки можливих побічних ефектів досліджували вплив дизоразолу Е1 на непроліферативні клітини та на біосинтез білка (таблиця 6).

Таблиця 6

Вплив дизоразолу Е1 на непроліферативні клітини та на біосинтез білка

Речовина	Конц. [мкМ]	Клітини, що вижили, первинні гепатоцити людини ¹ В середньому, % від контролю	Синтез білка ² В середньому, % від контролю
Дизоразол Е1	1	119,6	95,9

¹) Випробували, застосовуючи alamarBlue, первинні гепатоцити людини, n=3;

²) Випробували шляхом включення ¹⁴C-метіоніну, клітин гепатоцелюлярної карциноми людини (HepG2), n=2;

Результати в таблиці 6 демонструють, що дизоразол Е1 не має негативного впливу ні на біосинтез білка, ні на виживаність непроліферативних клітин.

нтез білка, ні на виживаність непроліферативних клітин.

