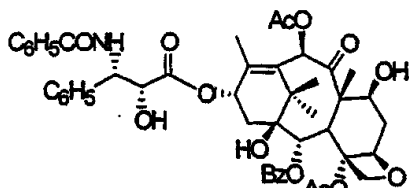


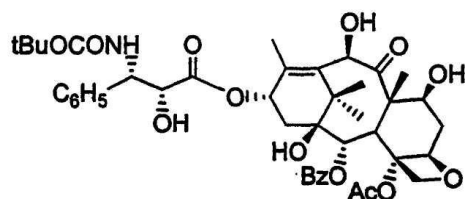
Даний винахід стосується нових таксанів, що мають корисність як протипухлинні агенти.

Таксани сімейства терпенів, до якого належать бакатин III та таксол, звичайно відомий також як палітаксел, є предметом значного інтересу як з біологічної, так і з хімічної точки зору. Таксол, зокрема, використовується як протираковий хіміотерапевтичний агент з широким діапазоном пухлинно-інгібуючої активності. Таксол має конфігурацію 2'R, 3'S та наступну структурну формулу:



де Ac є ацетил, а Bz є бензоїл.

Колін (Colin) та інші в описі до патенту США №4814470 повідомляють, що деякі аналоги таксолу мають активність, яка значно перевищує активність таксолу. Один із таких аналогів, що звичайно відомий як доцетаксел (Taxotere®), має наступну структурну формулу:



Незважаючи на те, що таксол і доцетаксел є придатними хіміотерапевтичними агентами, існує межа їхньої ефективності, в тому числі є обмеженою їхня ефективність проти деяких типів раку, та має місце токсичність для суб'єктів при застосуванні їх у різних дозах. Тому залишається потреба у додаткових хіміотерапевтичних агентах з підвищеною ефективністю та з меншою токсичністю.

Таким чином, однією з задач даного винаходу є запровадження таксанів, що вигідно відрізняються від таксолу та доцетакселу в плані їх ефективності як протипухлинних агентів та в плані токсичності. Загалом, ці таксани є заміщеними циклопентиловим ефіром при C10, кето-групою при C9, гідрокси-групою при C7, тінілом при C3' та ізопропоксикарбаматом при C3'.

Отже, даний винахід стосується таксанів, по суті, їх проліків, фармацевтичних композицій, що містять таксан і фармацевтично прийнятний носій, способів їх застосування та до способів приготування медикаментів, що містять таксани чи проліки.

Інші задачі та переваги даного винаходу будуть частково очевидними, а частково будуть вказані далі.

Фігура 1 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували сполукою 9091 у порівнянні зі сполукою 3071, при дослідженні клітинної лінії Рапс-1 (пероральні дози q4dX4).

Фігура 2 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували сполукою 9091 в порівнянні зі сполукою 3071, при дослідженні клітинної лінії HT29 (пероральні дози q4dX4).

Фігура 3 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували сполукою 9091 при дослідженні клітинної лінії HT29 (пероральні одноразові дози по 60мг/кг).

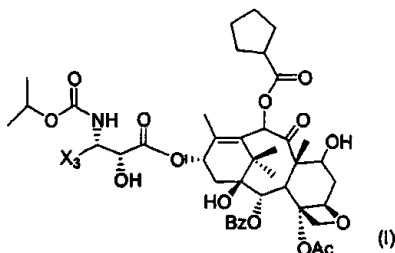
Фігура 4 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували сполукою 9091 при дослідженні клітинної лінії Рапс-1 (пероральні одноразові дози по 60мг/кг і 120мг/кг).

Фігура 5 зображує криву середнього росту пухлини в мишей, яких лікували в/в (внутрішньовенними) дозами сполуки 9091 при дослідженні клітинної лінії HT29.

Фігура 6 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували плацебо (розчинами) чи q4dX4 в/в дозами сполуки 9091 в 5%E-95%I-20, 5%ET в сольовому розчині, та 5%EC в сольовому розчині, при дослідженні клітинної лінії HT29; (E - етанол; I -інтраліпід; T - твін; C - кремофор; наприклад, 5% EC в сольовому розчині є 5% етанолу та 5% кремофору в сольовому розчині).

Фігура 7 зображує криві середнього росту пухлини в мишей, яких лікували в/в дозами сполуки 9091 при дослідженні клітинної лінії Рапс-1.

Таксан згідно з винаходом, що заявляється, має наступну хімічну структуру:

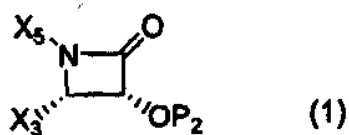


де X₃ є тініл, Ac є ацетил, а C7 гідрокси замісник і C10 циклопентилкарбонілокси замісник незалежно один від одного мають альфа чи бета стереохімічну конфігурацію. В одному із втілень винаходу X₃ є 2-тініл. В одному з кращих втілень винаходу X₃ є 2-тініл, а C7 гідрокси замісник і C10 циклопентилкарбонілокси замісник обидва мають бета стереохімічну конфігурацію.

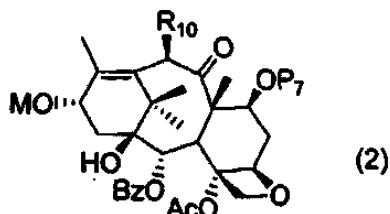
Сполуки згідно з винаходом, що заявляється, є більш активними проти ракових утворень, ніж таксани, які

традиційно застосовуються, відносно певних типів пухлин, включаючи лінії пухлин, що є чутливим й стійкими до паклітакселу (таксолу). Сполуки згідно з винаходом, що заявляється, є однаково прийнятними як для перорального, так і внутрішньовенного застосування й можуть бути ефективними як одноразова чи багаторазова доза із покращеними профілями токсичності. Сполуки згідно з винаходом, що заявляється, також є ефективними з некремоформними носіями (наповнювачами).

Таксани згідно з винаходом, що заявляється, можуть бути виготовлені шляхом оброблення β -лактаму алкоксидом, що має таксанові тетрациклічні ядра та оксид металу як замісник при C-13, з утворенням сполук, які мають β -амідоєфірний замісник при C-13 (як описано більш докладно в патенті Холтона(Нокон) США №5466834), з наступним відщепленням гідрокси-захисних груп, β -лактама має наступну структурну формулу (1):



де P_2 є гідрокси-захисною групою, X_3 є тієніл і X_5 є ізопропоксикарбоніл, а алкоксид має структурну формулу (2):



де М є металом або амонієм, P_7 є гідрокси-захисною групою, а R_{10} є циклопентилкарбонілокси.

Алкоксид структурної формули (2) може бути одержаний із 10-деацетилбакатину III (або його похідного) шляхом селективного захисту C7 гідроксильної групи, наступної естерифікації C10 гідроксильної групи та наступною обробкою амідом металу. В одному з втілень даного винаходу C7 гідроксильна група 10-деацетилбакатину III є селективно захищена силільною групою, як це описано, наприклад, Денісом (Denis) та інш. (J. Am. Chem. Soc, 1988, 110, 5917). Загалом, силілувальні агенти можуть використовуватись кожен окремо чи в комбінації з каталітичною кількістю основи, такої як основа лужного металу.

Як альтернатива, C10 гідроксильна група таксану може бути селективно ацилювана у відсутності основи, як описано, наприклад, Холтоном та інш. (Holton et al.) в міжнародній патентній заявці РСТ № WO 99/09021. Ацилювальні агенти, що можуть використовуватись для селективного ацилювання C10 гідроксильної групи таксану, містять заміщені чи незаміщені алкільні чи арильні ангідриди. Хоча ацилювання C10 гідроксильної групи таксану відбувається адекватним чином для багатьох ацилювальних агентів, було встановлено, що швидкість реакції може бути збільшена включенням кислоти Льюїса в реакційну суміш. Кращі кислоти Льюїса містять хлорид цинку, хлорид олова, трихлорид церію, хлорид міді, трихлорид лантану, трихлорид диспрозію та трихлорид ітербію. Хлорид цинку чи трихлорид церію є кращими, якщо ацилювальним агентом є ангідрид.

Процеси одержання та розділення β -лактамового вихідного матеріалу, загалом, добре відомі. Наприклад, β -лактама може бути одержаний, як описано Холтоном та інш. (Holton et al.) у патенті США №5430160 (кол. 9, рядки 2-50) або Холтоном (Holton) у патенті США №6649632 (кол. 7, рядок 45 - кол. 8, рядок 60), які обидва є включеними таким чином посиланнями на них у повному обсязі. Утворені в результаті енаціомерні суміші β -лактамів можуть бути розділені шляхом стереоселективного гідролізу з використанням ліпази чи ензиму, як описано, наприклад, у патентах Пателя (Patel) США №5879929 (кол. 16, рядок 1 - кол. 18, рядок 27) чи США №5567614, або гомогенату печінки, як описано, наприклад, у патенті Холтона (Holton) США №6548293 (кол. 3, рядки 30 - 61). Так, наприклад, у патенті США № 6649632 розкрито приготування β -лактаму, який має фурилний замісник в C4 положенні β -лактаму. З деякими змінами, що є очевидними для фахівців, може бути приготовлений β -лактама, який має тієнільний замісник в C4 положенні, як це поілюстровано у вказаних патентах і як буде далі розкрито в Прикладі 1.

Сполуки згідно з винаходом, що заявляється, можуть бути передбачені в формі проліків. Взагалі, фармацевтично прийнятна похідна чи проліки - це будь-яка фармацевтично прийнятна сіль, ефір, сіль ефіру чи інша похідна сполуки згідно з винаходом, яка після введення отримувачеві є спроможною до забезпечення, безпосередньо чи опосередковано, сполуки згідно з винаходом або інгібіторно активного метаболіту чи його залишку. Особливо сприятливі похідні чи проліки - ті, що підвищують біологічну засвоюваність сполук згідно з винаходом, коли такі сполуки вводять пацієнту (наприклад, дозволяючи сполуці, яку вводять перорально, бути більш готовою до абсорбування кров'ю), чи такі, що збільшують поставку вихідної сполуки до біологічного відділу (наприклад, мозкова чи лімфатична система) відносно вихідних різновидів. Фармацевтично прийнятні проліки включають, але не обмежуються цим вичерпно, таксани за винаходом, що заявляється, дериватизовані з однією чи декількома з наступних груп: фосфати, півалоїлоксиметил, ацетоксиметил, фталідил, інданіл, метоксиметил, мезилат, метилпіридинія, бікарбонат, онійні солі, фосфоноксиметилкарбонат, цинамат, амінокислота, бензоїл, ацил, тіоарил, поліетилен гліколі, поліалкіленоксид, декстран, полівінілові спирти, полімери на основі вуглеводів, олігопептид, поліглутаминова кислота, поліамінова кислота, онійні солі 2-галогенизованих азааренів, високополімерний аміноцукор, тощо. Положення в молекулі таксану згідно з винаходом, придатні для утворення проліків, включають, але не обмежуються цим вичерпно, положення C2' та положення C7. Різні види проліків є відомими. Приклади таких

похідних проліків див.: (a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985); (b) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krosgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5, "Design and Application of Prodrugs," by H. Bundgaard, p. 113-191 (1991); (c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992); (d) H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77,285 (1988); and (e) N. Kakeya, et al., Chem Phar Bull, 32, 692 (1984).

Сполуки згідно з винаходом, що заявляється, є придатними для інгібування росту пухлин у ссавців, включаючи людей, і застосовуються переважно у формі фармацевтичних композицій, що містять ефективну протипухлинну кількість сполуки згідно з даним винаходом у комбінації з, принаймні, одним фармацевтично чи фармакологічно прийнятним носієм. Носій, відомий також спеціалістам як наповнювач, розріджувач, допоміжний засіб, ад'ювант або розчинник, являє собою речовину, яка є фармацевтично інертною, надає відповідну консистенцію чи форму даній композиції, та не послабляє терапевтичної ефективності протипухлинних сполук. Носій є "фармацевтично чи фармакологічно прийнятним", якщо він не викликає несприятливих, алергічних або інших небажаних реакцій, коли вживається за призначенням ссавцем або людиною.

Фармацевтичні композиції, що містять протипухлинні сполуки згідно з даним винаходом, можуть бути складені у будь-який звичайний спосіб. Відповідний рецепт залежить від обраної схеми їх введення. Композиції згідно з даним винаходом можуть призначатися для будь-якої схеми їх введення у такій мірі, наскільки доступною при цьому є потрібна тканина. Придатні схеми введення включають, але не обмежуються цим вичерпно, пероральне, парентеральне (наприклад, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, підшкірне, ректальне, внутрішньом'язове, внутрішньоорбітальне, внутрішньокапсулярне, внутрішньоспінальне, внутрішньоперитонеальне чи внутрішньогрудне), місцеве (назальне, черезшкірне, внутрішньоочне), внутрішньоміхурове, внутрішньооболонкове, ентральне, легеневе, внутрішньоолімфатичне, внутрішньопорожнинне, вагінальне, трансуретральне, внутрішньошкірне, вушне, інтрамамарне, трансбуквальне, ортотопічне, внутрішньосуглобове, внутрішньотрахеальне, черезротове, черезшкірне, ендоскопічне, через слизову оболонку, під'язичне та кишкове введення.

Фармацевтично прийнятні носії для застосування в композиціях згідно з даним винаходом добре відомі звичайним спеціалістам і вибираються з урахуванням багатьох факторів: особливості використовуваної протипухлинної сполуки, її концентрація, стабільність та наперед призначена біологічна придатність; захворювання, розлад чи стан, що будуть лікуватися цією композицією; суб'єкт, його вік, розміри та загальний стан; схема введення ліків. Придатні носії легко визначаються звичайним спеціалістом (див., наприклад, J.G.Naim, в Remington's Pharmaceutical Science (A.Gennaro, ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1985) pp. 1492-1517, зміст якої приєднується до цього посиланням).

Композиції переважно призначаються як таблетки, дисперсні порошки, пілюлі, капсули, гелеві капсули, гелі, ліпосоми, гранули, розчини, суспензії, емульсії, сиропи, еліксири, драже або інші дозовані форми, які можуть застосовуватись для перорального прийому. Технічні прийоми та складові для виготовлення пероральних дозованих форм, що можуть бути використані в даному винаході, описані в таких публікаціях: 7 Modern Pharmaceutics. Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (1981); and Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976).

Згідно з винаходом композиції для перорального застосування містять ефективну кількість протипухлинної сполуки згідно з винаходом у фармацевтично прийнятному носії. Придатні носії для твердих дозованих форм містять цукри, крохмалі та інші загальноприйнятні речовини, в тому числі лактозу, тальк, сахарозу, желатин, карбоксиметилцелюлозу, агар, манітол, сорбітол, фосфат кальцію, карбонат кальцію, карбонат натрію, каолін, альгінову кислоту, акацієву смолу, кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, натрієвий сахарин, карбонат магнію, трагакант, мікрокристалічну целюлозу, колоїдний діоксид кремнію, кроскармелоз натрію, стеарат магнію та стеаринову кислоту. Крім того, такі тверді дозовані форми можуть бути як не покритими оболонками, так і покритими з використанням відомих технічних прийомів; наприклад, щоб затримати дезінтеграцію та абсорбцію.

Протипухлинні сполуки згідно з даним винаходом також переважно призначаються для парентерального застосування, наприклад, для ін'єкції через внутрішньовенний, внутрішньоартеріальний, підшкірний, ректальний, внутрішньом'язовий, внутрішньоорбітальний, внутрішньокапсулярний, внутрішньоспінальний, внутрішньоперитонеальний чи внутрішньогрудний шляхи. Композиції згідно з винаходом для парентерального застосування містять ефективну кількість протипухлинної сполуки згідно з винаходом у фармацевтично прийнятному носії. Дозовані форми, придатні для парентерального застосування містять мікстури, суспензії, дисперсії, емульсії або інші дозовані форми, які можуть застосовуватись для парентерального введення. Технічні прийоми та складові для приготування парентеральних дозованих форм відомі спеціалістам.

Придатні носії, що використовуються для утворення рідких дозованих форм для перорального або парентерального введення, містять безводні фармацевтично прийнятні полярні розчинники, такі як олії, спирти, аміді, прості ефіри, складні ефіри, кетони, вуглеводні та їхні суміші, а також воду, фізіологічні розчини, розчини декстрази (наприклад, 5%-ний), електролітні розчини або будь-яку іншу водну, фармацевтично прийнятну рідину.

Придатні безводні, фармацевтично прийнятні полярні розчинники включають, але не обмежуються цим вичерпно, алкоholes (наприклад, α - гліцеролформаль, β -гліцеролформаль, 1,3-бутиленгліколь, аліфатичні або ароматичні спирти, що мають 2-30 атомів вуглецю, таких як метанол, етанол, пропанол, ізопропанол, бутанол, трет-бутанол, гексанол, октанол, амілен-гідрат, бензиловий спирт, гліцерин (гліцерол), гліколь, гексиленгліколь, тетрагідрофурфуриловий спирт, лауриловий спирт, цетиловий спирт, чи стеариловий спирт, складні ефіри жирних кислот або жирних спиртів, такі як поліалкіленгліколі (наприклад, поліпропіленгліколь, поліетиленгліколь), сорбітан, сахароза та холестерол); аміді (наприклад, диметилацетамід (DMA), бензилбензоат DMA, диметилформамід, N- β -гідроксиетил-лактамід, N,N-диметилацетамід, 2-піролідіон, 1-метил-2-піролідіон або полівінілпіролідон); складні ефіри (наприклад, 1-метил-2-піролідіон, 2-піролідіон,

ацетатні ефіри, такі як моноацетин, діацетин та триацетин, аліфатичні та ароматичні ефіри, такі як етилкаприлат або етилоктаноат, алкілолеат, бензилбензоат, бензилацетат, диметилсульфоксид (ДМСО), гліцеринові ефіри, такі як моно-, ди- або тригліцерил цитрати чи тартрати, етилбензоат, етилацетат, етилкарбонат, етиллактат, етилолеат, складні ефіри жирних кислот сорбітану, складні ефіри ПЕГ жирних кислот, гліцерилмоностеарат, гліцеридові ефіри, такі як моно-, ди- або тригліцериди, складні ефіри жирних кислот, такі як ізопропилміристат, складні ефіри ПЕГ жирних кислот, такі як ПЕГ-гідроксиолеат та ПЕГ-гідроксистеарат, N-метилпіролідинон, плуронік 60, поліоксиетилен сорбітол олеїнові поліефіри, такі як полі(етоксилований)³⁰⁻⁶⁰ сорбітол полі(олеат)²⁻⁴, полі(оксиетилен)¹⁵⁻²⁰ моноолеат, полі(оксиетилен)¹⁵⁻²⁰ моно 12-гідроксистеарат та полі(оксиетилен)¹⁵⁻²⁰ монорицинолеат, поліокси сорбітанові складні ефіри, такі як поліокси-етилен сорбітан моноолеат, поліокси-етилен сорбітан монопальмітат, поліокси-етилен сорбітан монолаурат, поліокси-етилен сорбітан моностеарат та полісорбат (Polysorbate®) 20, 40, 60 або 80 фірми ICI Americas, Wilmington, DE, полівінілпіролідон, модифіковані алкіленоксидами складні ефіри жирних кислот, такі як гідрогенізована поліоксидом 40 рицинова олія та поліоксиетилізовані рицинові олії (наприклад, розчин Кремофору EL (Cremophor® EL) або розчин Кремофору RH 40 (Cremophor® RH)), складні ефіри сахаридів жирних кислот (серед яких конденсований продукт моносахариду (наприклад, пентози, такі як рибоза, рибулоза, арабіноза, ксиліоза, ліксіоза та ксилулоза, гексози, такі як глюкоза, фруктоза, галактоза, маноза та сорбоза, тріози, тетрози, гептози та октози), дисахариди (наприклад, сукроза, мальтоза, лактоза та трегалоза) або олігосахарид чи його суміш з C₄-C₂₂ жирною кислотою (кислотами) (наприклад, насичені жирні кислоти, такі як каприлова кислота, лауринова кислота, міристинова кислота, пальмітинова кислота та стеаринова кислота, і ненасичені жирні кислоти, такі як пальмітолеїнова кислота, олеїнова кислота, елаїдинова кислота, ерукова кислота та / лінолеїнова кислота), або стероїдні ефіри); алкілові, арилові або циклічні ефіри, що містять 2-30 атомів вуглецю (наприклад, діетиловий ефір, тетрагідрофуран, диметилловий ізосорбід, діетиленгліколь моноетиловий ефір); глікофуrol (поліетиленгліколевий ефір тетрагідрофурфурилового спирту); кетони, що містять 3-30 атомів вуглецю (наприклад, ацетон, метилетиловий кетон, метил-ізобутиловий кетон); аліфатичні, циклоаліфатичні або ароматичні вуглеводні, що містять 4-30 атомів вуглецю (наприклад, бензен, циклогексан, дихлорометан, діоксолани, гексан, n-декан, n-додекан, n-гексан, сульфолан, тетраметилсульфон, толуен, диметилсульфоксид (ДМСО) або тетраметиловий сульфоксид); мінеральні масла, рослинні олії, тваринні жири, ефірні олії та синтетичні масла (наприклад, мінеральні масла, такі як аліфатичні вуглеводні або вуглеводні на парафіновій основі, ароматичні вуглеводні, змішані аліфатичні та ароматичні вуглеводні, та рафіноване парафінове масло, рослинні олії, такі як льняна, тунгова, сафлорова, соєва, рицинова, бавовняна, свиріпова, кокосова, пальмова, маслинова, кукурудзяна, кунжуттова, персикова та арахісова олія, та гліцериди, такі як моно-, ди- або тригліцериди, тваринні жири, такі як риб'ячий жир, жири морських тварин, спермацетовий жир, жир з печінки тріски, сквален, сквалан та жир з печінки акули, олеїнові олії, поліоксиетилізована рицинова олія); алкілові або арилові галогеніди, що містять 1-30 атомів вуглецю та факультативно більш ніж один галоген-замісник; метилхлорид; моноетаноломід; нафтовий бензин; тропамін; омега-3 поліненасичені жирні кислоти (наприклад, альфа-лінолева кислота, ейкозапентаєнова кислота, докозапентаєнова кислота або докозагексаєнова кислота); полігліколевий ефір 12-гідроксистеаринової кислоти та поліетиленгліколь (солютол (Solutol®) HS-15 фірми BASF, Людвігсгафен, Німеччина); поліоксиетиленгліцероль; лаурат натрію; олеат натрію або сорбітан моноолеат.

Інші фармацевтично прийнятні розчинники для застосування у винаході добре відомі звичайним спеціалістам та ідентифіковані в The Chemotherapy Source Book (Williams & Wilkins Publishing), The Handbook of Pharmaceutical Excipients, (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., and The Pharmaceutical Society of Great Britain, London, England, 1968), Modern Pharmaceutics. (G. Banker et al., eds., 3d ed.) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1995), The Pharmacological Basis of Therapeutics, (Goodman & Gilman, McGraw Hill Publishing), Pharmaceutical Dosage Forms, (H. Lieberman et al., eds.,) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1980), Remington's Pharmaceutical Sciences (A. Gennaro, ed., 19th ed.) (Mack Publishing, Easton, PA, 1995), The United States Pharmacopeia 24. The National Formulary 19. (National Publishing, Philadelphia, PA, 2000), A.J. Spiegel et al., та Use of Nonaqueous Solvents in Parenteral Products, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 52, No. 10, pp. 917-927 (1963).

Кращими розчинниками є ті, що відомі як стабілізатори протипухлинних сполук, такі як олії, багаті на тригліцериди, наприклад, сафлорова олія, соєва олія або їхні суміші, та модифіковані алкіленоксидами складні ефіри жирних кислот, такі як гідрогенізована поліоксидом 40 рицинова олія та поліоксиетилізовані рицинові олії (наприклад, розчин Кремофору EL (Cremophor® EL) або розчин Кремофору RH 40 (Cremophor® RH)). Комерційно досяжні тригліцериди включають емульговану соєву олію Інтралідід (Intralipid® Kabi-Pharmacia Inc., Stockholm, Sweden), емульсію Нутралідід (Nutralipid®) (McGaw, Irvine, California), 20% емульсія Ліпозин II (Liposyn®II) (20% розчин жирової емульсії, яка містить 100мг сафлорової олії, 100мг соєвої олії, 12мг фосфатидів яєчного жовтка та 25мг гліцерину на 1мл розчину; Abbott Laboratories, Chicago, Illinois), 2% емульсія Ліпозин III (Liposin®III) (2% розчин жирової емульсії, яка містить 100мг сафлорової олії, 100мг соєвої олії, 12мг фосфатидів яєчного жовтка та 25мг гліцерину на 1мл розчину; Abbott Laboratories, Chicago, Illinois), похідні натурального або синтетичного гліцеролу, які містять докозагексаєнольну групу на рівні між 25% та 100% по масі від загальної кількості жирної кислоти (Dhasco® (фірма Martek Biosciences Corp., Columbia, MD), DHA Maguro® (Datio Enterprises, Los Angeles, CA), Soyacal® та Travemulsion®). Етанол є кращим розчинником для застосування при розчинянні протипухлинних сполук у форму розчинів, емульсій і тому подібне.

Додаткові другорядні компоненти, які можуть бути включені в композиції згідно з винаходом для різноманітних цілей, добре відомі у фармацевтичному виробництві. Ці компоненти здебільшого надають властивостей, які покращують збереження протипухлинної сполуки в місцеположенні введення, захищають стабільність композиції, регулюють pH, полегшують приведення протипухлинної сполуки до фармацевтичних форм і тому подібне. Краще, коли кожен з цих компонентів є окремо присутнім в кількості менш ніж приблизно 15 масових % від загальної кількості композиції, ще краще - менш ніж приблизно 5 масових % та найкраще - менш ніж приблизно 0,5 масових %. Деякі компоненти, такі як наповнювачі або розріджувачі, можуть

становити до 90 масових % від загальної кількості композиції, як це добре відомо в рецептурній справі. Ці домішки включають криозахисні речовини для запобігання репреципітації таксану, поверхнево-активні, рідкі або емульсовані речовини (наприклад, лецитин, полісорбат-80, Твін 80 (Tween®80), пліуронік 60, поліоксидиленовий стеарат), запобіжники (наприклад, етил-п-гідробензоат), протимікробні запобіжники (наприклад, бензиловий спирт, фенол, м-крезол, хлоробутанол, сорбієва кислота, тимеросал та парабен), речовини для регулювання pH або буферні речовини (наприклад, кислоти, основи, ацетат натрію, сорбітан монолаурат), речовини для регулювання осмолярності (наприклад, гліцерин), загусники (наприклад, моностеарат алюмінію, стеаринова кислота, цетиловий спирт, стеариновий спирт, гуарова камедь, метилцелюлоза, гідроксипропіл целюлоза, тристеарин, цетиловий ефір, поліетиленгліколь), барвники, розріджувачі, нелетучі силікони (наприклад, циклометикон), глини (наприклад, бентоніти), адгезиви, нагромаджувачі, ароматизуючі речовини, підсолоджувачі, адсорбенти, наповнювачі (наприклад, цукри, такі як лактоза, цукроза, маніт або сорбіт, целюлоза або сульфат кальцію), розріджувачі (наприклад, вода, фізіологічний розчин, електролітні розчини), зв'язуючі речовини (наприклад, крохмалі, такі як маїсовий крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль або картопляний крохмаль, желатин, трагакант, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, натрій-карбокси-метилцелюлоза, полівінілпіролідон, цукри, полімери, камедь акацієвого дерева), дезінтегратори (наприклад, крохмалі, такі як кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль, картопляний крохмаль або карбоксиметилловий крохмаль, зшитий полівінілпіролідон, агар, альгінова кислота або її сіль, така як альгінат натрію, кроскармелоза натрію або кросповідон), мастила (наприклад, кремнезем, тальк, стеаринова кислота або її солі, такі як стеарат магнію або поліетиленгліколь), оболонкові речовини (наприклад, концентровані цукрові розчини, включаючи гуміарабік, тальк, полівініл піролідон, карбопол гель, поліетиленгліколь або діоксид титану), та антиоксиданти (наприклад, метабісульфіт натрію, бісульфіт натрію, сульфід натрію, декстроза, феноли та тіофеноли).

Застосування дозованої форми може бути безперервним або переривчастим в залежності, наприклад, від фізіологічного стану пацієнта, від того, чи є мета застосування терапевтичною або профілактичною, та від інших факторів, добре відомих кваліфікованим професіоналам.

Дозування та схеми застосування фармацевтичних композицій згідно з винаходом можуть бути легко визначені тими, хто має досвід звичайного лікування раку. Зрозуміло, що доза протипухлинної сполуки залежатиме від віку, статі, стану здоров'я та ваги реципієнта, виду іншого одночасного лікування, частоти лікування та природи бажаного ефекту. При будь-якому способі застосування фактична кількість протипухлинної сполуки, що призначається, також як і схема дозування, необхідна для досягнення сприятливих ефектів, описаних тут, повинні залежати, зокрема, від таких факторів, як біопридатність протипухлинної сполуки, розлад, що потребує лікування, бажана терапевтична доза та інші фактори, очевидні для професіоналів. Доза, що застосовується для тварин, і особливо при лікуванні людей, в контексті даного винаходу повинна бути достатньою для того, щоб викликати бажану терапевтичну відповідь у тварини протягом поміркованого періоду часу. Краще, якщо ефективна кількість протипухлинної сполуки, котра застосовується пероральним чи іншим шляхом, є такою кількістю, яка призведе до бажаної терапевтичної відповіді, коли вона буде застосована таким шляхом. Краще, коли композиції для перорального застосування приготовані в такий спосіб, що поодинокі дози в тому чи іншому з пероральних препаратів містять, принаймні, 20мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта або, принаймні, 50, 100, 150, 200, 300, 400 чи 500мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта, причому в середньому площа поверхні тіла людини сягає 1,8м². Краще, якщо поодинокі дози композиції для перорального застосування містять від приблизно 20мг до приблизно 600мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта, ще краще від приблизно 25 до приблизно 400мг/м², також краще від приблизно 40 до приблизно 300мг/м² та ще краще від приблизно 50 до приблизно 200мг/м². Краще, коли композиції для парентерального застосування приготовані в такий спосіб, що поодинокі дози містять, принаймні, 20мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта або, принаймні, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400 чи 500мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта. Краще, якщо поодинокі дози в одному чи більше парентеральних препаратах містять від приблизно 20мг до приблизно 500мг протипухлинної сполуки на 1м² площі поверхні тіла пацієнта, ще краще від приблизно 40 до приблизно 400мг/м² та ще краще від приблизно 60 до приблизно 350мг/м². Проте, дозування може змінюватись в залежності від схеми дозування, яка може бути встановлена як необхідна для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Потрібно звернути увагу на те, що діапазони ефективних доз, що передбачені тут, не призначені до обмеження винаходу і репрезентують діапазони доз, яким віддається перевага. Найбільш сприятливе дозування повинно бути пристосоване до індивідуального суб'єкта, як це розуміє і визначає кожен з обізнаних у справі фахівців без непідходяжого експериментування.

Концентрація протипухлинної сполуки в рідкій фармацевтичній композиції знаходиться переважно поміж приблизно 0,01мг та приблизно 10мг на 1мл композиції, краще між приблизно 0,1мг та приблизно 7мг на 1мл, ще краще між приблизно 0,5мг та приблизно 5мг на 1мл, та найкраще між приблизно 1,5мг та приблизно 4мг на 1мл. Відносно низькі концентрації є взагалі такими, яким надається перевага, бо протипухлинна сполука є найбільш розчинною в розчинах з низькою концентрацією. Концентрація протипухлинної сполуки у твердій фармацевтичній композиції для перорального застосування є переважно поміж приблизно 5 масових % та приблизно 50 масових % по відношенню до загальної ваги композиції, краще між приблизно 8 масових % та приблизно 40 масових %, та ще краще між приблизно 10 масових % та приблизно 30 масових %.

Згідно з одним втіленням винаходу, розчини для перорального застосування готують шляхом розчинення протипухлинної сполуки в будь-якому фармацевтично прийнятному розчиннику (наприклад, етанолі чи поліетиленгліколі), здатному розчинити сполуку з утворенням розчину. Відповідну кількість носія, що є сурфактантом, такого як розчин Кремофора EL (Cremophor® EL), полісорбат 80, Солютол HS15 або вітамін E-TPGS, додають до розчину при помішуванні з утворенням фармацевтично прийнятного розчину для перорального застосування пацієнтом. Наприклад, отримані в результаті цього композиції можуть містити приблизно до 10% етанолу та/або приблизно до 10% сурфактанта, більш типові концентрації можуть бути приблизно 5 - 10 об'ємних % етанолу з еквівалентним об'ємом сурфактанта та дистильованою водою в

діапазоні 80 - 90% за об'ємом. Заради смаку, фракція дистильованої води може бути замінена розчином вишневого або малинового сиропу, краще 10 - 30% сиропу з водним залишком. В одному з втілень винаходу, концентрація сполуки 9091 в такому розчині сягає від 2 до 4мг/мл. При бажанні, ці розчини можуть бути утворені так, щоб вони містили мінімальну кількість етанолу або щоб вони взагалі були вільними від етанолу, який, як відомо спеціалістам, призводить до несприятливих фізіологічних реакцій, коли вживається в певних концентраціях в пероральних формах. В кращому втіленні, розчин містить приблизно 5% етанолу, приблизно 5% сурфактанта, що є вибраним з полісорбату 80 (напр., Tween®80), поліетоксильованих касторових олій (напр., Cremophor®) та їх сумішей, і приблизно 90% дистильованої води.

В іншому втіленні винаходу, порошки або таблетки для перорального вживання готують шляхом розчинення протипухлинної сполуки у будь-якому фармацевтично прийнятному розчиннику (наприклад, в етанолі чи поліетилеогліколі), здатному розчинити сполуку з утворенням розчину. Розчинник факультативно може бути здатен випаровуватись, коли розчин сушиться у вакуумі. Додатковий носій, такий як розчин Кремофор EL (Cremophor® EL), може бути доданий до розчину перед сушінням. Розчин, одержаний таким чином, висушують у вакуумі до утворення склистої маси. Цю масу змішують потім зі зв'язуючим для утворення порошку. Порошок може бути змішаний з наповнювачами або з іншими загальноприйнятими таблетуючими речовинами та оброблений у форму таблеток для перорального вживання пацієнтом. Порошок може бути також додано до будь-якого рідкого носія, що був описаний раніше, щоб утворити розчин, емульсію, суспензію чи тому подібне для перорального застосування.

Емульсії для парентерального застосування можуть бути приготовлені шляхом розчинення протипухлинної сполуки у будь-якому фармацевтично прийнятному розчиннику (наприклад, в етанолі чи поліетилеогліколі), здатному розчинити сполуку з утворенням розчину. Відповідну кількість носія, що є жировою емульсією, такою як емульсія Ліпозин II (Liposyn II), Ліпозин III (Liposyn® III) або Інтраліпід (Intralipid®), додають до розчину при помішуванні для утворення фармацевтично прийнятної емульсії для парентерального вживання пацієнтом. Наприклад, отримані в результаті цього композиції можуть містити приблизно до 10% етанолу та/або приблизно до 90% носія (жирової емульсії). В одному з втілень винаходу, концентрація сполуки 9091 в дозованому розчині складає приблизно 1-2мг/мл. Типово, емульсія містить приблизно від 10% до 20% жиру, краще приблизно 20% жиру. При бажанні, ці жирові емульсії можуть бути утворені так, щоб вони містили мінімальну кількість або щоб вони взагалі були вільними від етанолу чи розчину Кремофору (Cremophor®), які, як відомо спеціалістам, призводять до несприятливих фізіологічних реакцій, коли застосовуються в певних концентраціях у парентеральних формах. В кращому втіленні, емульсія містить приблизно 5% етанолу та приблизно 95% жирової емульсії (напр., Інтраліпід 20%, Ліпозин II 20%, або їх суміш). В цьому кращому втіленні, отримана в результаті композиція є вільною від агентів, які, як відомо спеціалістам, призводять до несприятливих фізіологічних реакцій, таких як поліетоксильовані касторові олії (напр., Cremophor®) та полісорбат 80 (напр., Tween®80).

Розчини для парентерального застосування можуть бути приготовані шляхом розчинення протипухлинної сполуки у будь-якому фармацевтично прийнятному розчиннику (наприклад, в етанолі чи поліетилеогліколі), здатному розчинити сполуку з утворенням розчину. Відповідну кількість носія, що є сурфактантом, такого як розчин Кремофора (Cremophor®), полісорбат 80, Солютол HS15, додають до розчину при помішуванні для утворення фармацевтично прийнятної розчину для парентерального вживання пацієнтом. Наприклад, отримана в результаті цього композиція може містити приблизно до 10% етанолу та/або приблизно до 10% сурфактанта, більш типова концентрація може бути приблизно 5 - 10 об'ємних % етанолу з еквівалентним об'ємом сурфактанта та сольового розчину в діапазоні 80 - 90% за об'ємом. При бажанні, ці розчини можуть бути утворені так, щоб вони містили мінімальну кількість або щоб вони взагалі були вільними від етанолу чи розчину Кремофора (Cremophor®), які, як відомо спеціалістам, призводять до несприятливих фізіологічних реакцій, коли застосовуються в певних концентраціях в парентеральних формах.

В кращому втіленні, розчин містить приблизно 5% етанолу, приблизно 5% полісорбату 80 (напр., Tween®80) або поліетоксильованих касторових олій (напр., Cremophor®), то приблизно 90% сольового розчину (0,9% хлориду натрію). Для мінімізації потенційно можливих несприятливих фізіологічних реакцій (напр., реакцій гіперчутливості) є бажаним, щоб пацієнт, який отримує розчин згідно з цим втіленням винаходу, був попередньо пролікований дексаметазоном, дифенгідраміном або будь-якою іншою речовиною, відомою фахівцям, як засіб мінімізації чи елімінації цих несприятливих реакцій.

Інші придатні парентеральні форми містять ліпосоми. Ліпосоми звичайно являють собою сферичні та сфероїдальні кластери чи агрегати амфіпатичних сполук, включно ліпідні сполуки, типово у вигляді одного чи більше концентричних шарів, наприклад, моношарів або бідарів. Ліпосоми можуть бути утворені з іонних і неіонних ліпідів. Ліпосоми з неіонних ліпідів відносять також до ніосом. Посилання на ліпосоми містять: (a) *Liposomes Second Edition: A Practical Approach*, під редакцією V. Torchilin та V. Weissig, Oxford University Press, 2003; (b) M. Malmstein, *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc., 2002; і (c) Muller та інші, *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, Medpharm Scientific Publishers, 1998.

При бажанні, описані вище емульсії або розчини для перорального чи парентерального застосування можуть бути впаковані в ампули, пляшечки або інші звичайні контейнери в концентрованій формі та розбавлені будь-якою фармацевтично прийнятною рідиною, такою як соловий розчин, щоб перед застосуванням отримати прийнятну концентрацію таксану, як це відомо спеціалістам.

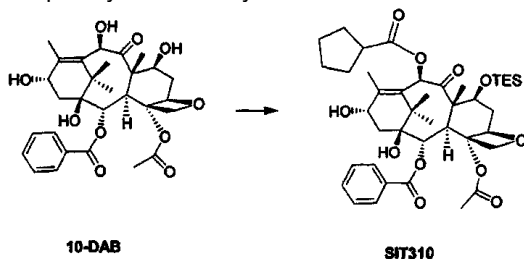
Терміни „гідроксил-захисна група" та „гідрокси-захисна група", які тут вживаються, означають групу, що здатна захистити вільну гідроксильну групу („захиснений гідроксил"), яка, внаслідок проведення реакції для її захисту, може бути видалена без порушення залишку молекули. Різновиди захисних груп для гідроксильної групи та їх синтез можна знайти в книзі „Захисні групи в органічному синтезі" - "Protective Groups in Organic Synthesis" by T.W.Greene, John Wiley and Sons, 1981, or Fieser&Fieser. Типові гідроксил-захисні групи включають метоксиметил, 1-етоксиметил, бензилметоксиметил, (бета-триметилсилілетоксиметил, тетрагідропіраніл, 2,2,2-трихлорометоксикарбоніл, трет-бутил(дифеніл)силіл, триалкілсиліл, трихлорометоксикарбоніл та 2,2,2-трихлоретоксиметил.

Як тут вживається, "Ac" означає ацетил; "Bz" означає бензоїл; "TES" означає триетилсиліл; "TMS" означає триметилсиліл; "LAN" означає алюмогідрид літію; "10-DAB" означає 10-дезацетилбакатин III; "THF" означає тетрагідрофуран; "DMAP" означає 4-диметиламінопіридин; "LHMDS" означає гексаметилдисілазанид літію; "TESCl" означає триетилсилілхлорид; "cPtc-Cl" означає циклопентанкарбоніл хлорид; "DMF" означає N,N-диметилформамід; "MOP" означає 2-метилоксіпропен; "iProc" означає N-ізопропоксикарбоніл; "iProc-Cl" означає ізопропілхлоромат; "LDA" означає діізопропіл літію.

Наступні приклади ілюструють винахід.

Приклад 1

Приготування сполуки 9091



Захист і ацилювання 10-DAB до SIT310. Застосовуючи наступну процедуру подвійної реакції захисту C7-гідроксиду 10-дезацетилбакатина III (10-DAB) триетилсилілхлоридом (TESCl) та ацилювання його C10-гідроксиду циклопентанкарбоніл хлоридом (cPtc-Cl), отримували SIT310.

Переважно, реакція виконувалась з використанням прозорого розчину 6мл DMF на 1г 10-DAB (10-DAB розчиняється в DMF до ~ 5мл/г при 22° С, але розчинювання поліпшується при охолодженні до 0-5°С). Додавання DMAP до розчину 10-DAB в DMF при кімнатній температурі допомагає його розчинності. Краще, щоб безводні розчинники і реактори знаходились в атмосфері інертного газу азоту. Вода поглинати триетилсилілхлорид з молярним співвідношенням 1:2.

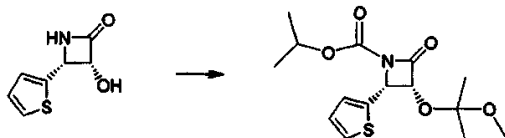
У висушену в термошафі 1-літрову покриту тригорлову кругло донну колбу (RBF), обладнану магнітним перемішувачем, датчиком внутрішньої температури і краплинною лійкою, в атмосфері інертного газу азоту були поміщені 10-DAB (54,46г, 0,100моль), DMAP (36,60г, 0,300моль) і безводний DMF (330мл). Суміш (0,3М) розмішували при температурі 22°С до отримання прозорого світложовтого розчину. Реакційна суміш була охолоджена до внутрішньої температури реактора 0-5°С циркуляційним холодильником.

7-TES захист. В краплинну лійку ввели TESCl (17,6мл, 0,105моль, 1,05екв.). Коли внутрішня температура реактора була < 5°С, почали додавати краплинно TESCl, щоб контролювати екзотермічний процес і підтримувати внутрішню температуру реактора < 5°С (20-30 хвилин часу додавання). Після додавання 15мл TESCl почалося осадження солі DMAP-HCl. Після того, як додавання було завершено, реакційну суміш розмішували 2,5 години при температурі від 0 до 5°С. TLC (тонкошарова хроматографія) контроль (3:1, EtOAc:Гептани) показав невелику кількість початкового матеріалу (Rf=0,20) у порівнянні з 7-TES-10-DAB продуктом (Rf=0,65). HNMR аналіз зразків реакційної суміші показав, що кількість початкового матеріалу склала 2,5% продукту відповідно до інтегралів протонних резонансів C10 карбінолу. Була введена додаткова кількість TESCl (0,45мл, 0,0027моль), і суміш розмішували при температурі від 0 до 5°С. Після 2 годин, HNMR аналіз зразків показав <1% початкового 10-DAB і приблизно 1,2% 7,13-бісильованого побічного продукту (реакційна суміш розмішувалася всю ніч без подальших змін).

Формування 10-cPtc: В краплинну лійку ввели циклопентанкарбоніл хлорид (12,76мл, 0,105моль) і краплинно додавали до колби протягом більш ніж 30 хвилин, щоб контролювати екзотермічний процес і підтримувати внутрішню температуру реактора <10°С. Після того, як додавання було завершено, реакційну суміш розмішували при температурі 12 - 22°С більш ніж 12 годин. TLC контроль реакційної суміші показав приблизно 95%-не перетворення в менш поляризований продукт. HNMR аналіз зразків реакційної суміші показав, що проміжного 7-TES-10-DAB залишалося 4,5% щодо продукту відповідно до інтегралів протонних резонансів C10 карбінолу. Була введена додаткова кількість cPtc-Cl (0,55мл, 0,0045моль) і суміш розмішували протягом 4,5 годин. TLC контроль (1:1, EtOAc:Гептани) показав повне перетворення в продукт, і було почато очищення продукту.

Очищення речовини: Реакційну суміш поступово вливали в 3-літрову колбу зі швидким розмішуванням, що містила 1,5л крижаної води, протягом більш ніж 5 хвилин до формування товстого білого осаду. Після розмішування протягом 15 хвилин, осад було забрано вакуумною фільтрацією через фарфорову лійку Бюхнера. Фільтраційний корж був ретельно відмитий чистою водою. Водний фільтрат не показав наявності продукту при TLC контролі і був злитий. Фільтраційний корж розчинили в етилацетаті (300мл) і зібрали у вакуумну фільтраційну колбу. Колба була вимита етилацетатом (100мл) у фільтрат етилацетату. Фільтрат був переданий у 2-літрову ділільну лійку і вимитий водою (1x100мл), насиченим розчином бікарбонату натрію (1x100мл) і розсолем (1x50мл). Органічний шар був висušений над MgSO₄ (30 g) протягом 1 години. MgSO₄ був фільтрований і вимитий етилацетатом у фільтрат. Фільтрат був сконцентрований обертовою евапорацією при температурі 40°С до ~ 100мл. Етилацетат, що залишився, був замінений ацетонітрилом (500мл). Суміш була далі концентрована, доки не було отримано кристалічне формування приблизно 375мл ацетонітрилу, що залишались у випарній колбі. Концентрування було зупинено, і 50мл ацетонітрилу було додано, щоб допомогти перемішуванню кристалів. Після того розчин охолоджували до -20°С протягом 1 години в обертовому автоклаві. Кристали були зібрані вакуумною фільтрацією. Фільтраційний корж був вимитий охолодженням до -20°С ацетонітрилом (150мл) і гептанами (200мл) навколишньої температури. Кристали висušували у високому вакуумі (<0,1мм в. ст.) при температурі 22°С протягом ночі до постійної ваги (59,90г, 79,3%). Мр: 241-243°С, чистота 97,5% (HPLC). KF: 0.96% по масі води. HNMR аналіз відповідав структурі SIT310. $[\alpha]_D^{20} = -43,5$ (MeOH, 2,07).

Фільтрат ацетонітрилу був сконцентрований обертовою евапорацією до 100мл щоб викликати другий вихід кристалів.



SIT302

SIT304

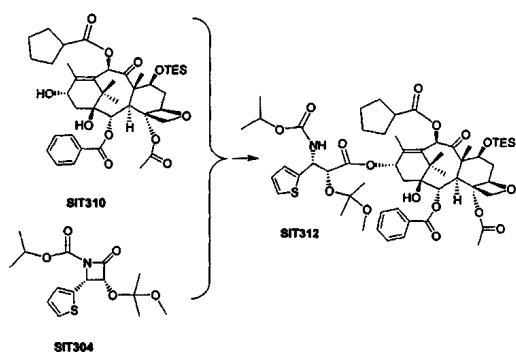
Тандемні захист і N-ацилювання-перетворення SIT302 у SIT304. Застосовуючи наступну процедуру тандемної реакції захисту SIT302 гідроксилу 2-метилоксипропеном (MOP) і введення N-ізопропоксикарбонілової (iProc) групи з використанням ізопропілхлоромату (iProc-Cl), отримували SIT304.

Переважно, наступні реакції проводять при безводних умовах і в атмосфері інертного газу азоту. Скляний посуд і обладнання повинні бути вимиті в триетиламіні та ретельно висушені. MOP легко полімеризується в кислоти на рівні слідів при температурах $> 0^{\circ}\text{C}$. SIT302 осаджується при температурі -25°C при концентрації $< 15\text{мг ТНФ/г}$.

Захист MOP: У висушену 2-літрову колбу RBF з магнітним перемішувачем в атмосфері азоту, обладнану 0,5-літровою краплинною лійкою та датчиком низької температури, були введені SIT302 (36,0г, 0,213моль) і THF (540мл) для отримання прозорого світложовтого розчину. Розчин був охолоджений до температури -25°C , після чого до нього було додано pTsOH моногідрат (1,8г, 9,4ммоль). В краплинну лійку ввели MOP (23,5мл, 0,245моль). Коли внутрішня температура реактора досягла -25°C , почали додавати краплинно MOP зі швидкістю, яка забезпечила контроль екзотермічного процесу і підтримування температури реактора $< -25^{\circ}\text{C}$ (15 хвилин). Після завершення додавання TLC контрольне елюювання 2:1 етилацетат:гептани показало в залишку $\sim 15\%$ SIT302 ($R_f=0,2$). Додаткова кількість MOP (5мл, 0,052моль) була введена краплинно протягом 5 хвилин, щоб завершити перетворення в менш поляризований MOP-захисний SIT302 ($R_f=0,5$). Реакція утворення кеталю була пригнічена триетиламіном (108мл, 0,775моль) при температурі -25°C .

N-ацилювання: Після того, як MOP-захисна реакція була пригнічена, до реакційної колби ввели DMAP (3,24г, 0,0265моль) і нагрівали до температури навколишнього середовища. Краплинну лійку висушили в азотному струмені і наповнили iProc-Cl (245мл, 1,0М в толуені, 0,245моль). Коли температура реактора була 22°C , почали додавати краплинно хлоромат, щоб забезпечити контроль екзотермічного процесу і підтримування температури реактора нижче 28°C . Додавання було закінчене за 30 хвилин з отриманням білого осаду триетиламонієвого хлориду. Після перемішування при температурі навколишнього середовища протягом 1 години, TLC контрольне елюювання 1:1 етилацетат:гептани показало $\sim 90\%$ - не перетворення й 10% -ний залишок MOP-SIT302. Додаткова кількість iProc-Cl була введена в реакцію. Після перемішування протягом 2,5 годин при температурі 22°C , TLC показав повне перетворення в менш поляризований продукт, і було почато очищення продукту.

Очищення речовини: В реакційну суміш ввели 1:1 суміш насиченого бікарбонату натрію:розсолу (300мл) і 10 хвилин енергійно розмішували. Потім суміш перемістили в 2-літрову ділильну лійку і шари були відсепаровані. Нижній водний шар дренали й злили. Органічний шар промили двічі розсолом (2x100мл) і висушили над MgSO_4 (15г) протягом 1 години при перемішуванні. MgSO_4 був відфільтрований, а фільтраційний корж був вимитий етилацетатом, щоб забезпечити повне добування продукту (TLC). Фільтрат перемістили до 3-літрового евапоратора і концентрували обертовим вакуумним випарюванням при температурі 40°C в масло, щоб видалити толуен і THF розчинники. В'язке масло було розчинене в етилацетаті (500мл) у випарувальну колбу обертового евапоратора, до якої протягом 10 хвилин вводили гептани (1500мл) при доброму перемішуванні. Прозорий розчин був далі зконцентрований у вакуумі. Після того, як приблизно 350мл розчиненої суміші було видалено, почалось формування кристалів, і вакуумне концентрування було припинено. Суміш охолоджували при постійному обертанні протягом 1 години при температурі 22°C , потім протягом 1 години при 0°C . Кристали були зібрані вакуумним фільтруванням, а фільтраційний корж був вимитий холодними гептанами (150мл). Продукт висушили у високому вакуумі (0,1мм рт. ст.) при температурі навколишнього середовища до постійної ваги (51,52г, 0,157моль, 73,7%). Фільтрат зконцентрували до приблизно 200мл за об'ємом до 100мл щоб викликати другий вихід кристалів. Після охолодження до 0°C протягом 1 години, другий вихід було зконцентровано вакуумним фільтруванням та промито гептанами ($\sim 50\text{мл}$) і висушено обидва виходи, що показали однакову чистоту (61,52г, 88,4%). Мр: $74 - 75^{\circ}\text{C}$, чистота HPLC 99,4%. KF: 1,48% по масі води. HNMR аналіз кристалів відповідав структурі SIT304. $[\alpha]_D^{20} = + 3,6$ (MeOH, 0,93). Зберігається у вимитій триетиламіном колбі в атмосфері азоту при температурі $< -20^{\circ}\text{C}$.



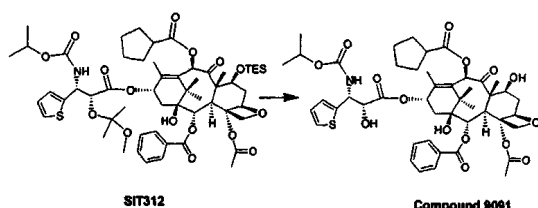
Алкоксид літієве зв'язування - перетворення SIT310 у SIT312. Застосовуючи наступну процедуру, SIT312 і SIT304 були з'єднані, щоб отримати SIT312.

Реакції є дуже вологочутливими. Переважно, реакції проводять в атмосфері інертного газу азоту в зневоднених реакторах і розчинниках. Діізопропіл літій (LDA) повинен бути свіжоприготовленим перед застосуванням.

Приготування LDA: У висушену в термошафі 250-мілілітрову колбу RBF з магнітним перемішуванням в атмосфері азоту та датчиком внутрішньої температури, були введені діізопропіламін (13,1мл, 92,98ммоль) і THF (26мл). Суміш була охолоджена до -45°C , і краплинно ввели свіжоприготовлений титрований розчин n-BuLi (54мл, 1,62M, 85,83ммоль) для контролю екзотермічного процесу і підтримувannya температури реактора $<-40^{\circ}\text{C}$. Після завершення 30 хвилинного краплинного введення, охолоджувальна ванна була підігріта до $0-5^{\circ}\text{C}$ перед використанням.

Реакція зв'язування: У висушену в термошафі 1-літрову колбу RBF з магнітним перемішуванням в атмосфері азоту та датчиком внутрішньої температури, були введені SIT310 (54,0г, 71,525ммоль), SIT304 (28,1г, 85,83ммоль) і THF (325мл, 0,22M). Суміш була охолоджена до -45°C . В краплинну лійку ввели свіжоприготовлений LDA, який додавали краплинно в реакційну колбу протягом 30 хвилин для контролю екзотермічного процесу і підтримувannya температури реактора $<-40^{\circ}\text{C}$. Після завершення додавання температуру реактора підвищили до -20°C і забезпечили розмішування протягом 1,5 годин. TLC контроль реакції (1:3/EtOAc:Гепт) показав наявність $\sim 10\%$ SIT31 (Rf4),25), $\sim 90\%$ продукту SIT312 і відсутність стартового SIT304. Додаткова кількість SIT304 (2,8г, 8,56ммоль) у вигляді твердої речовини була додана до реакційної суміші. Після розмішування протягом 1,5 годин при температурі -20°C реакцію було завершено TLC дослідженням і почато очищення продукту.

Очищення: Для пригнічення реакції у реакційну колбу при -20°C була додана 1:1 суміш насиченого бікарбонату натрію та розсолу (100мл). Реакційну колбу нагріли до температури навколишнього середовища й перевели її вміст до ділильної лійки. Для полегшення розшарування був введений етилацетат (200мл). Водну фазу дренували і злили. Органічний шар знову відмили розсолем (50мл) і висушили над MgSO_4 (30г). MgSO_4 відфільтрували, а фільтраційний корж відмили етилацетатом (100мл) у фільтрат. Фільтрат концентрували обертовою евапорацією у вакуумі до приблизно 150мл за об'ємом. Залишки розчинника замістили ізопропанолом (500мл). Після додаткового концентрування до об'єму приблизно 350-400мл почалось формування кристалів і концентрування припинилось. Суміш охолоджували при помішуванні протягом 1 години до температури 0°C . Кристали були зібрані вакуумним фільтруванням та промиті попередньо охолодженим до 0°C ізопропанолом (200мл) і висушили до постійної ваги (73,58г, 68,0ммоль, 95,0%) у високому вакуумі (0,1мм рт. ст.). HNMR спектр кристалів відповідав структурі SIT312. Мр: $137-140^{\circ}\text{C}$, чистота HPLC 95,4%. Це було нестабільно в умовах приготування HPLC (рідинна хроматографія) і втрати 2'-MOP захисту під час проведення аналізу.



Тандемні зняття захисту - перетворення SIT312 у 9091. Застосовуючи наступну процедуру, тандемне зняття захисних груп MOP і TES сполуки SIT312 в кислотних умовах продукувало 9091.

У покриту 1-літрову колбу RBF, обладнану магнітним перемішувачем, датчиком внутрішньої температури і краплинною лійкою, були поміщені SIT312 (70,0г, 64,67ммоль) і THF (350мл, 0,185M). Суміш була охолоджена до 0°C за допомогою циркуляційної ванни. Краплинну лійку наповнили мурашиною кислотою (96%, 175 мл, 4,45ммоль). Мурашину кислоту додавали краплинно протягом 30 хвилин, контролюючи екзотермічний процес і підтримувannya температури реактора $<10^{\circ}\text{C}$. Після завершення додавання мурашиної кислоти в краплинну лійку вмістили 1,0M HCl (87,5мл, 87,5ммоль). Краплинне додавання HCl було проведено для того, щоб контролювати екзотермічний процес і підтримувannya температури реактора $<10^{\circ}\text{C}$. TLC аналіз реакційної суміші (1:1 EtOAc:Гепт) після додавання показав, що відсутність захисної групи MOP обумовила появу більш поляризованого продукту (Rf=0,65) у порівнянні до SIT312 (Rf=0,7). Суміш перемішували при температурі від 8 до 10°C . Після 9 годин перемішування TLC показав $>95\%$ перетворення в більш поляризований продукт разом з приблизно 2-3% побічного продукту (Rf=0,55) і 1% проміжного продукту (Rf=0,65), після чого було почато

очищення продукту.

Очищення: Реакційна суміш була розбавлена етилацетатом (1л), переміщена в 3-літрову ділильну лійку і промита двічі водою (2x500мл), двічі - насиченим бікарбонатом натрію (2x100мл). Контроль водної фази показав відсутність продукту при TLC дослідженні. Органічний шар сушили над Na₂SO₄ (100г) протягом 1 години. Na₂SO₄ відфільтрували гравітаційно за допомогою фільтрувального паперу Ватман №1 (Whatman No. 1), фільтраційний корж промили етилацетатом, щоб забезпечити повне видобування продукту. Фільтрат концентрували вакуумною обертовою евапорацією, що дало піну (65,59г). HNMR спектр піни відповідав структурі 9091 разом з триетилсилілуваними побічними продуктами.

Рекристалізація: Піна була розчинена в етилацетаті (280мл) і нагріта до 50°C з перемішуванням. Протягом 15 хвилин поступово додавали гептани (455мл), щоб забезпечити прозорість розчину. Суміш поступово охолоджували до температури навколишнього середовища. Після 1 години витримки при 22°C були введені зародкові кристали і протягом 5 хвилин відбувалось створення кристалів. Суміш охолоджували в водяній ванні з температурою 0°C протягом 1 години, після чого кристали були зібрані вакуумним фільтруванням, а фільтраційний корж було відмито холодною сумішшю 1:4 EtOAc:гептани (200мл) з температурою 0°C HPLC аналіз показав 98,5% рівень чистоти. Білий порошок сушили протягом 2 днів при температурі 50°C і високому вакуумі (0,1мм рт. ст.) до постійної ваги (40,58г, 45,3ммоль, 70,0%). Мр: 159 - 161°C, чистота HPLC 98,5%. ¹HNMR і ¹³CNMR спектри відповідали структурі 9091. [α]_D²⁰ = -43,1 (MeOH, 0,91).

Маточний розчин першої рекристалізації концентрували, що дало 15,0г воскоподібного матеріалу. Він був розтертий в порошок з гептанами (200мл), щоб отримати приблизно 7г сипкого порошку. Порошок очистили колонною хроматографією зі силікагелем, використовуючи як елюент 1:1 етилацетат:гептани. Об'єднання фракцій, які містять 9091, і концентрування вакуумною обертовою евапорацією дало 5,84г сполуки 9091. Об'єднання фракцій, які містять домішки, дало 0,55г білої твердої речовини з HNMR спектром, що відповідає структурі 7-формат-9091.

Концентрування маточного розчину другої рекристалізації дала 4,50г матеріалу. Його було скомбіновано з 5,84г очищеної хроматографією речовини 9091 першого маточного розчину, щоб отримати 10,34г (17,8%).

Дані спектра ¹H NMR (CDCl₃) сполуки 9091
¹H і ¹³C ХІМІЧНІ ЗСУВИ сполуки 9091

№	Протон	ppm	Структура (J,Hz)	Вуглець	ppm
1	H-10'	1,10	d(6,19)	C19	9,541
2	CH ₃ -16	1,15	s	C18	14,829
3	H-11'	1,16	d(6,19)	C10'	21,833
4	CH ₃ -17	1,26	s	C16'	21,955
5	2H-24',25'	1,63	m	C20'	22,581
6	CH ₃ -19	1,68	s	C22'	25,816
7	OH-1	1,74	s	C11'	25,877
8	2H-24', 25'	1,76	m	C17	26,831
9	CH ₃ -18	1,86	d(0,94)	C24', 25'	29,593
10	H-10β	1,89	m	C23', 26'	30,356
11	2H-23', 26'	1,93	m	C6	35,545
12	2H-23', 26'	2,02	m(6,64)	C15	43,206
13	H-14α	2,30	ddd(15,30, 9,12)	C14	43,732
14	CH ₃ -20'	2,39	s	C3	45,685
15	H-6α	2,54	ddd(14,04, 9,57, 6,57)	C3'	53,026
16	H-14β	2,56	dd(15,30, 4,11)	C8	58,626
17	H-22'	2,92	m(7,36, 6,85)	C9'	69,057
18	OH-2'	3,44	d(5,47)	C7	72,216
19	H-3	3,83	d(6,98)	C13	72,429

20	H-20β	4,18	d(8,48)	C2'	73,421
21	H-20α	4,31	d(8,48)	C2	75,001
22	H-7α	4,42	m(10,52, 4,29)	C10	75,176
23	H-2'	4,66	dd(5,47, 2,24)	C20	76,481
24	H-9'	4,78	bm(6,19)	C1	79,129
25	H-5	4,95	bd(9,57, 1,88)	C4	81,181
26	H-N	5,39	d(9,47)	C5	84,462
27	H-3'	5,55	dd(9,47, 2,24)	C7'	125,460
28	H-2	5,67	d(6,98)	C5'	125,544
29	H-13β	6,27	ddd(9,12, 4,11, 0,94)	C6'	127,039
30	H-10α	6,28	s	C15', 17'	128,664
31	H-6'	7,01	dd(4,03, 5,13)	C13'	129,115
32	H-5'	7,10	dd(4,03, 1,15)	C14', 18'	130,213
33	H-7'	7,29	dd(5,13, 1,15)	C16'	133,342
34	2H-15', 17'	7,50	dd(7,44, 7,12)	C11	133,655
35	H-16'	7,61	dd(7,44, 5,62)	C4'	141,277
36	2H-18', 14'	8,12	d(8,59)	C12	141,804
37				C8'	155,469
38				C12'	167,067
39				C20'	170,264
40				C1'	172,187
41				C21'	176,865
42				C9	203,746

Приклад 2

Цитотоксичний Тест Формування Колонії Клітин Пробірим Аналізом in Vitro

Чотириста клітин (лінії НСТ 116 карциноми ободової кішки людини, отриманої з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection, Manassas, Va)) помістили в 60-ти міліметрові чашки Петрі з 2,7мл живильного середовища (модифіковане середовище МакКоя 5а, що містить 10% ембріональної сироватки теляти та 100 одиниць/мл пеніциліну і 100г/мл стрептоміцину). Клітини інкубували в CO₂ інкубаторі при температурі 37° С протягом 5 годин для прикріплення до дна чашок Петрі. Сполука згідно звичаєм були свіжоприготовлена в середовищі з десятикратною остаточною концентрацією, після чого 0,3мл розчину цього матеріалу додали до 2,7мл середовища в чашці. Після цього клітини інкубували разом з ліками протягом 72 годин при температурі 37°С. Наприкінці інкубації середовище, що містить ліки, декантували, чашки промили 4 мл збалансованого сольового розчину Хенкса (HBSS), додали 5мл свіжого середовища та повернули чашки до інкубатора для формування колоній. Через 7 днів перелічили колонії клітин за допомогою лічильника колоній. Вирахували виживання клітин та встановили значення ID₅₀ (концентрація ліків, яка призводить до 50%-го інгібування утворення колоній) для кожної сполуки, що тестувалась.

Ідентичні оцінки були отримані з використанням клітин ліній VM46 (резистентний варіант карциноми ободової кішки людини НСТ 116, отриманий від доктора Лі-Ксі з Каліфорнійського Тихоокеанського Медичного Центру (Dr. Li-Xi, M.D., Ph.D., California Pacific Medical Center, CA), DLD-1 (резистентний варіант карциноми ободової кішки людини, отриманий з Американської колекції типових культур). Оцінки проводились подібним чином з використанням МТТ-тесту (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію бромід).

Сполука	IN VITRO ID ₅₀ (нм) HCT116	IN VITRO ID ₅₀ (нм) VM46	IN VITRO ID ₅₀ (нм) MTT:DLD-1
паклітаксел	2,1	20,0	10,1

доцетаксел	0,6	6,7	9,1
9091	0,6	1,9	1,5

Приклад 3

Оцінка Пероральної Ефективності Сполуки 9091

Ефективність сполуки 9091 була оцінена на ксенотрансплантаті пухлини підшлункової залози людини Рапс-1, отриманому з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection, Manassas, Va). Пухлину, використовувану для цього дослідження, підтримували у безтимусних голих мишах. Фрагмент пухлини (1мм³) імплантували підшкірно у правий бік кожної піддослідної миші. Пухлини перевірялись двічі на тиждень і потім щодня, коли їхній об'єм наблизився до 200-400мм³, в середньому до 250-300мм³. В перший день дослідження тварини були розділені на дослідні групи з розмірами пухлини 171,5-320,0мм³ і групу з середніми розмірами пухлини 212,6-216,0мм³. Розмір пухлини, в мм³, був обчислений за наступною формулою:

$$\text{Об'єм Пухлини} = \frac{W^2 \times L}{2}$$

де W= ширина і L= довжина пухлини в мм. Маса пухлини була оцінена з огляду на те, що 1мг є еквівалентним 1мм³ об'єму пухлини. Мишей розділили на групи по шість мишей у групі, і лікували відповідно до протоколу в Таблицях 1А і 1В. Усі ліки вводили перорально, один раз у перший день (qd x 1). Групи 2 і 3 отримали сполуку 9091 по 120 і 60мг/кг, відповідно. В усіх групах об'єм дози 0,6мл/20г маси тіла миші визначався відповідно до маси тіла кожної тварини. Кожна тварина була піддана евтаназії, коли її неоплазма досягала наперед визначеного розміру кінцевої точки (1200мм³). Час до кінцевої точки (TTE) для кожної миші було обчислено наступним рівнянням:

$$TTE = \frac{\log_{10}(\text{об'єм кінцевої точки}) - b}{m}$$

де TTE є виражений у днях, об'єм кінцевої точки - в мм³, b є точка перетину, am- нахил лінії, отриманої лінійною регресією логарифмічно перетвореного набору даних росту пухлини. Набір даних складається з першого спостереження про перевищення об'єму кінцевої точки дослідження і трьох послідовних спостережень, що безпосередньо передували досягненню об'єму кінцевої точки. Тваринам, що не досягли об'єму кінцевої точки, призначали значення TTE, яке дорівнює останньому дневі дослідження (59 днів). Тваринам, класифікованим як такі, що мали TR (пов'язані з лікуванням) смертельні випадки або NTRM (не пов'язані з лікуванням метастазування) смертельні випадки, призначали значення TTE, рівне дневі смерті. Тварини, класифіковані як такі, що мали NTR (не пов'язані з лікуванням) смертельні випадки, були виключені з обчислень TTE. Ефективність лікування характеризувалась гальмуванням росту пухлини (TGD), що визначалась як збільшення медіани TTE для дослідної групи в порівнянні з контрольною групою:

$$TGD = T - C,$$

виражений у днях, або як відсоток від медіани TTE контрольної групи:

$$\% TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$$

де: T = медіана TTE для дослідної групи і

C = медіана TTE для контрольної Групи 1.

Лікування може викликати часткову (PR) або повну (CR) регресію пухлини у тварини. При частковій відповіді (PR), об'єм пухлини - 50% або менше його об'єму в перший день для трьох послідовних обмірювань протягом дослідження, і рівний або більше ніж 13,5мм³ для одного або більше з цих трьох обмірювань. При повній відповіді (PR), обсяг пухлини - менше ніж 13,5мм³ для трьох послідовних обмірювань протягом дослідження. Тварина з повною відповіддю (CR) при завершенні дослідження була додатково класифікована як особина, що є довгоживучою без пухлини (LTTFs).

Щодо токсичності, тварин зважували щодня з 1-го по 5-й дні, потім двічі на тиждень до завершення дослідження. Мишей часто досліджували на наявність ознак будь-яких несприятливих, пов'язаних із препаратом побічних ефектів. Прийнятна токсичність для гранично допустимої дози (MTD) протипухлинного препарату для мишей визначена NCI (Національний інститут раку, США) як втрата середньої маси тіла (BW) в групі менше, ніж 20% протягом тесту, і не більше однієї токсичної смерті серед десяти протестованих тварин. Щоб дослідити розходження між значеннями TTE дослідної групи, яку лікували препаратом, і контрольної групи, якій ввели плацебо (розчинник), використовували логранговий тест. Логранговий тест аналізує дані усіх тварин, крім випадків смерті NTR. Двосторонні статистичні дослідження проводилися при P=0,05. Криві росту середнього об'єму пухлини в групі показують середній об'єм пухлини (MTV) як функцію часу. Коли тварина виходила з дослідження через розмір пухлини або смерть TR, заключний об'єм пухлини, зареєстрований для тварини, був включений в дані обчислювання середнього об'єму в наступних часових точках. Якщо більше ніж одна смерть відбулася в дослідній групі, крива росту пухлини такої групи була обрізана на час настання другого випадку смерті.

Групи 2 і 3 отримали сполуку 9091 по 120 і 60мг/кг, відповідно. Обидві групи 2 і 3 виявили 212%-ний TGD і дуже істотну протипухлинну активність (P <0,001). MTV (середні об'єми пухлин) для шести мишей у кожній групі, були 56 і 148мм³, відповідно. У Групі 2 сполука 9091 викликала три PR відповіді і три LTTFs. У Групі 3 сполука 9091 викликала п'ять PR відповідей і три LTTFs. Сполука 9091 забезпечила 100%-не виживання і шість PR відповідей на обидві дози в 120 і 60мг/кг: таке лікування забезпечило три й один LTTFs, і викликало втрати середньої маси тіла (BW) в групі на 5.5% і на 10.7%, відповідно.

Дані наведено в наступних Таблицях 1А і 1В:

Відповіді на Лікування при Дослідженні Рапс-1

Таблиця 1А

Група	n	Курс лікування 1				ТТЕ медіана	Т-С	% TGD
		Препарат	мг/кг	Шлях введення	Дозування			
1	6	5%ЕС в сольовому розчині		п/о	qdx 1	18,9	-	-
2	6	9091	120	п/о	gdxl	59,0	40,1	212%
3	6	9091	60	п/о	qdx 1	59,0	40,1	212%

ТТЕ - час до кінцевої точки (дні), 1200мг

Т-С - різниця між ТТЕ (дні) дослідних і контрольної груп, % TGD=[(Т - С)/С]

n - кількість мишей в групі

5%ЕС - 5% етанолу + 5% кремофору

п/о - перорально

Таблиця 1В

Група	Середня маса пухлини(n)	Кількість PR	Кількість CR	Кількість LTTES	Макс. % втрати маси;	Кількість	Кількість
	59-й день				День	TR	NTR
1	- (0)	0	0	0	-	0	0
2	56(6)	3	3	3	- 10,7% 10 день	0	0
3	148(6)	5	1	1	- 5,5% 10 день	0	0

CR - Пухлина, що не пальпується під час трьох послідовних вимірювань протягом дослідження

PR - Регресія пухлини до $\leq 50\%$ від її розміру на початку дослідження під час трьох послідовних вимірювань протягом дослідження

LTTES - особина, довгоживуча без пухлини, тварини, класифіковані як CR наприкінці дослідження

Логранговий тест є еквівалентним до тесту Мантеля-Хензеля (Mantel-Haenszel); ns= незначущий, *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, у порівнянні з Групою 1

TR- смерть, пов'язана з лікуванням

NTR - смерть, не пов'язана з лікуванням

Приклад 4

Оцінка Ефективності Внутрішньовенного Застосування Сполуки 9091

Протипухлинна ефективність 9091 була оцінена на ксенотрансплантаті пухлини підшлункової залози людини Рапс-1. Пухлину підшлункової залози людини Рапс-1 підтримували у безтимусних голих мишах. Фрагмент пухлини (1мм³) імплантували підшкірно у правий бік кожної піддослідної миші. Пухлини перевірялись двічі на тиждень і потім щодня, коли їхній об'єм наблизився до 200-400мм³, в середньому до 250-300мм³. В перший день дослідження тварини були розділені на дослідні групи з розмірами пухлини 171,5-320,0мм³ і групу з середніми розмірами пухлини 212,6-216,0мм³. Мишей розділили на групи по шість мишей у групі, і лікували відповідно до протоколу в Таблицях 1А і 1В. Усі ліки вводили внутрішньовенно. Контрольна Група 1 мишей отримала розчинник (плацебо) в складі 5% етанолу та 95% Ліпозину II, одноразово у перший день (qd x 1). Група 2 отримувала сполуку 9091 по 20мг/кг через день x 5. Група 3 отримувала 9091 по 30мг/кг q4d x 4. Групи 4 і 5 отримали сполуку 9091 qd x 1 по 120 і 60мг/кг, відповідно. Об'єми доз були 0,5мл/20г маси тіла для режиму дозування qd x 1 і 0,3мл/20г маси тіла для режиму дозування qod x 5 або q4d x 4. Об'єми доз визначались відповідно до маси тіла кожної тварини. Розчинник (плацебо) ввели мишам Групи 1 в перший день одноразовою дозою (qd x 1). Пухлини в п'яти з шістьох мишей, лікуваних розчинником, зросли до наперед визначеного об'єму кінцевої точки (1200мм³) з медіаною ТТЕ у 15,8 днів. Регресних відповідей зафіксовано не було. Наявність однієї особи, що залишилась живою після 56 днів, вказує на потенційно фоновий рівень одного до деякої міри незадовільного приживлення трансплантату на групу.

Група 2 отримувала 9091 по 20мг/кг qod x 5. Група 3 отримувала 9091 по 30мг/кг q4d x 4. Групи 4 і 5 отримали 9091 qd x 1 по 120 і 60мг/кг, відповідно. В Групі 5 було зафіксовано п'ять TR (пов'язаних з лікуванням) смертельних випадків, які не могли бути враховані для оцінки ефективності лікування. Дві миші Групи 4 вмерли з NTR (не пов'язаних з лікуванням) причин. Кожна з Груп 3-5 продемонстрували 254% TGD. Цей результат є високозначущим в групах 3 і 5 ($P < 0,01$), і значущим в групі 4 ($P < 0,05$). В групах 3-5 не було пухлин, що досягли б об'єму кінцевої точки; MTV (середні об'єми пухлин) для шести мишей у кожній групі були 40, 58 і 126мм³, відповідно. У Групі 3 було зафіксовано п'ять PR відповідей і один LTTFs. У кожній з Груп 4 та 5 було зафіксовано по шість PR відповідей. Сполука 9091 була найбільш ефективною в режимі дозування 30мг/кг q4d x 4. Таке лікування забезпечило п'ять PR відповідей і один LTTFs, хоча й призвело до

максимальної в ~13% втрати середньої маси тіла (BW) в групі. Одноразове дозування по 120 і 60мг/кг забезпечили по шість PR відповідей, з втратою середньої маси тіла (BW) в групі на ~8% і ~5%, відповідно. Ці три режими лікування забезпечили по шість виживших на кінець дослідження особин з MTV 40, 58 і 126мм³, відповідно.

Таблиця 2: Відповіді на Лікування при Дослідженні Рапс-1

Таблиця 2А

Група	n	Курс лікування 1				ТТЕ медіана	Т-С	% TGD
		Препарат	мг/кг	Шлях введення	Дозування			
1	6	розчинник		в/в	qd x 1	15,8	-	-
2	6	9091	20	в/в	qod x 5	10,0	-	-
3	6	9091	30	в/в	q4d x 4	56,0	40,2	254%
4	6	9091	120	в/в	qd x 1	56,0	40,2	254%
5	6	9091	60	в/в	qd x 5	56,0	40,2	254%

ТТЕ - час до кінцевої точки (дні), 1200мг

Т - С - різниця між ТТЕ (дні) дослідних і контрольної груп, % TGD=[(Т - С)/С]

n - кількість мишей в групі

в/в - внутрішньовенно

Таблиця 2В

Група	Середня маса пухлини(n) 56-й день	Кількість PR	Кількість CR	Кількість LTES	Значущість логрангового тесту	Макс. % втрати маси; День	Кількість TR	Кількість NTR
1	320 (1)	0	0	0	-	-	0	0
2	108 (1)	1	0	0	-	- 15,7%; 10 день	5	0
3	40,25 (6)	5	1	1	p < 0,01	- 13,2%; 17 день	0	0
4	57,5 (6)	6	0	0	p < 0,05	- 7,8%; 7 день	0	2
5	126 (6)	6	0	0	p < 0,01	- 4,9%; 7 день	0	0

CR - Пухлина, що не пальпується під час трьох послідовних вимірювань протягом дослідження

PR - Регресія пухлини до <=50% від її розміру перед початком дослідження під час трьох послідовних вимірювань протягом дослідження

LTES - особина, довгоживуча без пухлини, тварини, класифіковані як CR наприкінці дослідження

Логранговий тест є еквівалентним до тесту Мантеля-Хензеля (Mantel-Haenszel); ns= незначуще, *- p < 0,05, **- p < 0,01, ***- < 0,001, у порівнянні з Групою 1

TR - смерть, пов'язана з лікуванням

NTR - смерть, не пов'язана з лікуванням

Приклад 5

Дослідження Ефективності Сполуки 9091 на ксероплантанті HT29

Подібно до того, як описано в Прикладах 3 і 4 стосовно оцінки режимів перорального та внутрішньовенного застосування на ксенотрансплантаті Рапс-1, ефективність 9091 була оцінена також на ксенотрансплантаті HT29 (карцеюми ободової кишки людини, отриманої з Американської колекції типових культур). Результати наведені в Таблицях 3 і 4.

Таблиця 3А:

Протокол Дослідження HT29 із Застосуванням Сполуки 9091

Група	n	Курс лікування 1			
		Препарат	мг/кг	Шлях введення	Дозування
1	6	5%ЕС в сольовому розчині		п/о	qd x 1
18	6	9091	15	п/о	q4d x 4
19	6	9091	30	п/о	q4d x 4
20	6	9091	45	п/о	q4d x 4
21	6	9091	60	п/о	q4d x 4

Таблиця 3В:

Відповіді на Лікування при Дослідженні HT29 із Застосуванням Сполуки 9091

Група	n	Курс лікування 1				МДС на 1,0г	Макс.% BW	Смертність	
		Препарат	мг /кг	Шлях введення	Дозування	± СОС (n)	Втрата; День	TR	NTR
1	6	5%ЕС в сольовому розчині		п/о	qd x 1	16,5±1,5 (6)	-	0	0
18	6	9091	15	п/о	q4d x 4	24,4±1,4 (6)	-	0	0
19	6	9091	30	п/о	q4d x 4	25,6± (1)	-11,3%; 21 день	0	0
20	6	9091	45	п/о	q4d x 4	± (0)	- 22,6%; 17 день	0	0
21	6	9091	60	п/о	q4d x 4	± (0)	-28,1%; 17 день	4	0

n - кількість мишей в групі
5%ЕС - 5% етанолу + 5% кремофору

Таблиця 4А:

Структура Дослідження НТ29 із Застосуванням Сполуки 9091 (в/в)

Група	n	Курс лікування 1			
		Препарат	мг/кг	Шлях введення	Дозування
1	6	не лікували			
2	6	розчинник		в/в	q4d x 4
3	6	розчинник		в/в	q4d x 4
4	6	розчинник		в/в	q4d x 4
5	6	9091	120	в/в	qd x 1
6	6	9091	60	в/в	qd x 1
7	6	9091	120	в/в	qd x 1
8	6	9091	60	в/в	qd x 1
9	6	9091	120	в/в	qd x 1
10	6	9091	60	в/в	qd x 1
14	6	9091	30	в/в	q4d x 4
15	6	9091	20	в/в	q4d x 4
16	6	9091	30	в/в	q4d x 4
17	6	9091	20	в/в	q4d x 4
18	6	9091	30	в/в	q4d x 4
19	6	9091	20	в/в	q4d x 4

Таблиця 4В:

Зведені Відповіді на Лікування при Дослідженні НТ29 із Застосуванням Сполуки 9091

Гру-па	n	Курс лікування 1		Курс лікування 2		МДС на 1,0 г	Макс.% BW	Смертність	
		Препарат	мг /кг	Препарат	мг /кг	\pm СОС (n)	Втрата; День	TR	NTR
1	6	Не лікували				$16,1 \pm 3,0$ (10)	-	0	1
2	6	розчинник		5%E-95%I-20	0,3	$21,9 \pm 4,0$	-	0	0
3	6	розчинник		5%ЕТ в сольовому розчині	0,3	$18,4 \pm 3,6$	-	0	0
4	6	розчинник		5%ЕС в сольовому розчині	0,3	$20,4 \pm 2,9$	-	0	0
5	6	9091	120	5%E-95%I-20	0,5 x 2	\pm	- 11,8%; 10 день	0	0
6	6	9091	60	5%E-95%I-20	0,5	$51,9 \pm 0,0$	-8,9%; 7 день	0	0
7	6	9091	120	5%ЕТ в сольовому розчині	0,5 x 2	\pm	-23,7%; 10 день	0	0
8	6	9091	60	5%ЕТ в сольовому розчині	0,5	$51,8 \pm$	- 4,9%; 7 день	0	0
9	6	9091	120	5%ЕС в сольовому розчині	0,5 x 2	\pm	- 16,6%; 14 день	0	0
				5%ЕС в					

10	6	9091	60	сольовому розчині	0,5	46,0 ±	- 8,2%; 10 день	0	0
14	6	9091	30	5%E-95%I-20	0,3	±	- 15,6%; 17 день	0	0
15	6	9091	20	5%E-95%I-20	0,3	±	- 17,8%; 17 день	0	0
16	6	9091	30	5%ET в сольовому розчині	0,3	±	- 18,3%; 17 день	0	0
17	6	9091	20	5%ET в сольовому розчині	0,3	±	- 14,4%; 14 день	0	0
18	6	9091	30	5%EC в сольовому розчині	0,3	±	- 22,7%; 21 день	0	0
19	6	9091	20	5%EC в сольовому розчині	0,3	±	- 9,9%; 14 день	0	0
Смертність: TR (пов'язана з лікуванням); NTR (не пов'язана з лікуванням)									

Графічні результати оцінки сполуки 9091 у мишиних ксенотрансплантатах представлені на Фігурах 1-7.

Приклад 6

Токсикологічна Оцінка на Щурах In Vivo

Токсичність оцінювали на 250 - 300 грамових щурах Спрег-Доулі (Sprague Dawley), і по три щури використовувалися в дозовій групі. Дослідження провели на трьох дозових групах тестованої сполуки, а саме 3мг/кг, 9мг/кг і 12мг/кг для внутрішньовенного застосування; 15мг/кг, 30мг/кг і 40мг/кг; і 1 контрольна група. Тварини спостерігалися, і дані клінічної хімії були забрані в дні 4 і 10. Щури були піддані евтаназії на 11 день, і під час евтаназії були вирізані й зафіксовані для подальшої експертизи нерви.

Кожному щурові нараховували бали, як описане нижче, і визначили заключний бал токсичності, що поєднує всі параметри. Мертвому щурові призначено нульовий бал. Таблиця 5, наведена нижче, дає критерії того, яку частку в балах мав кожен параметр токсичності. Більшість параметрів вносить позитивне значення до максимально можливого балу 130. Для зменшень маси тіла, білих кров'яних клітин (лейкоцитів) і кров'яних пластинок (тромбоцитів) можливо відновлення. Якщо параметр не показує відновлення, то віднімають -5 балів від загальної кількості. Загальну кількість балів розділили на 13, щоб вмістити це в десятибальну шкалу (від 0 до 10 балів). Стосовно оцінки нейротоксичності, -10 вказує на те, що були помічені аксональні дегенеративні ураження, у той час як 0 вказує на те, що не було ніяких уражень.

Таблиця 5

Критерії Оцінки Токсичності для Щурів

Спостереження	Оцінка					
	Hi (0)	Так (1-4)			2 тижень відновлення	
Нейро-токсичність (Neu. Tox)	0	-10			Hi	Так
Втрата маси тіла (BW)	≥20%	≥15%	≥10%	< 10%		
	0	5	10	20	-5	0
Зменшення WBC	≥50%	≥25%	≥10%	<10%		
	0	5	10	20	-5	0
Зменшення PLT	≥75%	≥50%	≥25%	< 25%		
	0	5	10	20	-5	0
Підвищення AST	≥2Xконт	≥1,5Xконт	≥1,25Xконт	<1,25Xконт		
	0	5	10	20		
Підвищення ALT	≥2Xконт	≥1,5Xконт	≥1,25Xконт	<1,25Xконт		
	0	5	10	20		
Підвищення BUN	≥2Xконт	≥1,5Xконт	≥1,25Xконт	<1,25Xконт		
	0	5	10	20		

Водяниста	Hi	Так
діарея (W/L)	5	0
Кров'яниста	Hi	Так
діарея (B/M)	5	0

Максимальний бал (кожного щура) -130;

Avg = середнє 3-х груп

конт - контроль

AST - аспарагінова амінотрансфераза (АСТ);

PLT - кров'яні пластинки (тромбоцити);

WBC - білі кров'яні клітини (лейкоцити)

Груповий бал = середнє 3 щурів/13

Wt Avg = (Σ (доза x гр. бал))/24

ALT-аланінова амінотрансфераза;

BUN - азот сечовини крові

Зразок даних дослідження токсичності в щурів при пероральному дозуванні сполуки 9091 представлено в Таблиці 6.

Таблиця 6

Зразок вхідних даних оцінки токсичності в щурів; Дослідження перорального дозування

		R= відновлення					Сполука 9091									
Доза/щур	Neu Tox	BW	R	WBC	R	AST	ALT	виN	PTL	R	W/L Діар.	B/M Діар.	Заг. бал			
Висока доза 40мг/кг																
Щур 1		0	-5	0	0	20	20	20	5	0	0	0	60	60		
Щур 2	-10	0	0	0	0	20	20	10	20	-5	0	0	55	55		
Щур 3	-10	0	-5	0	0	20	20	20	20	0	0	0	65	65		
												Сер.	60	180	4,62	
Середня доза 40мг/кг																
Щур 1		5	0	0	0	20	20	20	20	0	0	0	85	85		
Щур 2		10	0	5	0	20	20	20	20	0	0	0	95	95		
Щур 3	-10	10	0	0	0	20	20	20	20	0	0	0	80	80		
												Сер.	86,7	260	6,67	
Низька доза 40мг/кг																
Щур 1		20	0	5	0	20	20	20	20	0	0	5	110	110		
Щур 2	-10	10	0	0	0	20	20	20	20	0	0	5	85	85		
Щур 3		20	0	0	0	20	20	20	10	0	0	5	95	95		
												Сер.	96,7	290	7,44	

Результата оцінки повного дослідження перорального та двох внутрішньовенних схем дозування на щурах підсумовані в Таблиці 7, наведеній нижче, в порівнянні з попередньо розкритим аналогом, сполукою 3071. Структура сполуки 3071 може бути знайдена в Прикладі 9.

Таблиця 7

Оцінки токсичності при дослідженнях на щурах сполуки 9091 (у порівнянні зі сполукою 3071)

		Оцінка токсичності			
Сполука/доза →		3мг	9мг	12мг	Середнє
в/в 3071		7,7	6	3,2	5,6
в/в 9091		9	7,1	7,8	7,9
в/в 9091		9,5	8,1	6,8	8,1
Сполука/доза →		15мг	30мг	40мг	Середнє
перорально 3071		6,2	5,1	1,5	4,3
перорально 9091		7,4	6,7	4,6	6,2
					Середньозважене
					4,8
					7,7
					7,6
					3,6
					5,8

Приклад 7

Оцінка ефективності в дослідженнях на мишиних ксенотрансплантатах In Vivo

Щоб спростити інтерпретацію досліджень мишиних ксенотрансплантатів, оцінка ефективності була виведена з результатів досліджень мишиних ксенотрансплантатів, що описані вище в Прикладах 4 і 5.

Оцінка = $10 \cdot (TWd1 - TWdn) / TW1$, де

TWd1 - маса пухлини в перший день,

TWdn - маса пухлини в 10 день і пізніше

Таким чином, кращою оцінкою для повної регресії було би 10. Результати для сполуки 9091 просумовані в Таблицях 8a і 8b в порівнянні з оцінками для сполук 3071 і 3102.

Таблиця 8A:

Ефективність сполуки 9091 у порівнянні зі сполукою 3071 в дослідженнях мишиних ксенотрансплантатів з одноразовою пероральною дозою в 60 і 120мг/кг

Сполука	Пухлина	Доза	Оцінка
3071	Panc-1	60	5,8
3071	Panc-1	120	7,3
3071	HT29	60	6,3
3071	HT29	120	7,5
9091	Panc-1	60	8,3
9091	Panc-1	120	9,1
9091	HT29	60	4,3
9091	HT29	120	8,7

Таблиця 8B:

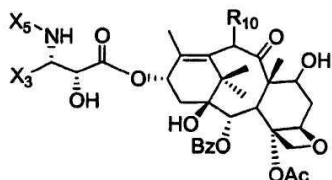
Ефективність сполуки 9091 у порівнянні зі сполукою 3102 в дослідженнях мишиних ксенотрансплантатів з одноразовою внутрішньовенною дозою

Сполука	Пухлина	Доза	Оцінка
3102	Panc-1	60	2,6
3102	Panc-1	120	5,3
3102	HT29	60	1,3
3102	HT29	120	5,3
9091	Panc-1	60	7,7
9091	Panc-1	120	8,6
9091	HT29	60	8
9091	HT29	120	8,7

Приклад 9

Порівняльні дані ефективності і токсичності

Додаткові дані ефективності з досліджень проліферації, так само як і досліджень токсичності щурів представлені в Таблиці 9 для порівняння сполук, що відповідають формулі



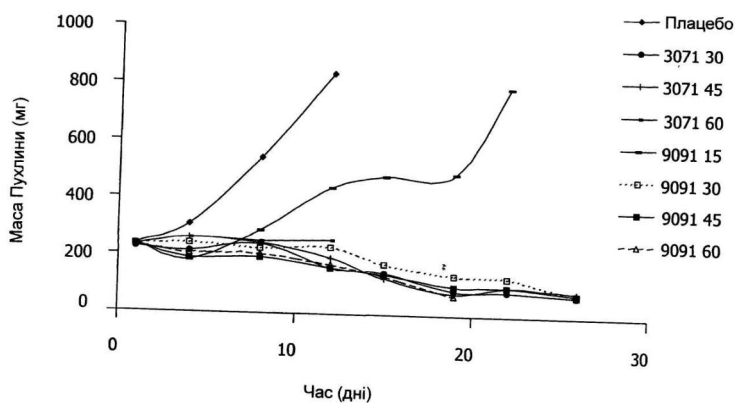
Усі сполуки, перераховані в Таблиці 9, за винятком сполуки 9091, розкриті в РСТ-публікації WO 01/57032.

Таблиця 9: Порівняльний огляд даних токсичності

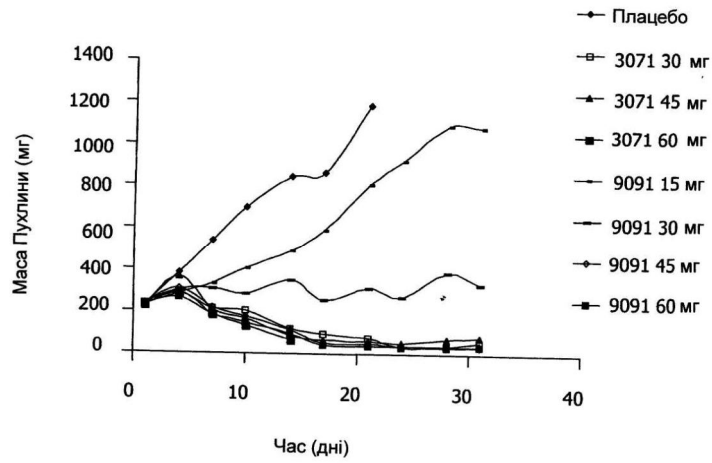
Сполука	X ₅	X ₃	R ₁₀	HCT116 IC ₅₀ , нМ	VM46 IC ₅₀ , нМ	Оцінка токсич- ності, в/в	Оцінка токсич- ності, п/о
паклітаксел	PhCO	Ph	AcO	2,1	20,0		
доцетаксел	tBuOCO	Ph	OH	0,6	6,7		
0843	tBuOCO	2fu	cproCOO	0,24	0,86	0	0
0854	tBuOCO	2th	cproCOO	0,05	0,09	1	0
2781	tBuOCO	3fu	cproCOO	0,18	1,91	1	0
2794	tBuOCO	3th	cproCOO	0,28	2,03		
2802	tBuOCO	2py	cproCOO	0,30	3,32		
2813	tBuOCO	4py	cproCOO	0,05	8,22		
3071	iPrOCO	2th	cproCOO	0,17	1,51	5	4
3102	iBuOCO	2fu	cproCOO	0,33	1,49	6	6
3129	iBuOCO	2th	cproCOO	1,53	2,88		
3132	nPrCO	2th	cproCOO	0,37	5,33		
3677	EtOCO	2fu	cproCOO	0,30	18,56		
3853	iPrOCO	2fu	cproCOO	0,08	0,99	1	1
4051	EtOCO	2th	cproCOO	0,30	1,62		5
4062	nPrCO	2fu	cproCOO	0,59	7,64		
4665	iBuOCO	3fu	cproCOO	2,13	28,45		
5011	iBuOCO	3th	cproCOO	2,99	8,47		
9091	iPrOCO	2th	cpentCOO	0,63	1,87	8,8	6

Результати досліджень, описаних вище, вказують, що сполука 9091 належить до класу ефективних препаратів проти декількох ліній пухлин. При порівнянні зі сполуками-аналогами сполука 9091 демонструвала кращий профіль токсичності у щурів, коли її вводили внутрішньовенно. На додачу до того, що вона має кращий профіль токсичності в пероральних дослідженнях щурів, сполука 9091 є більш ефективною, ніж сполука 3071 у дослідженнях ксенотрансплантатів з пероральною одноразовою дозою, і сполука 9091 набагато ефективніша, ніж сполука 3102 (інший аналог) у дослідженнях ксенотрансплантатів з внутрішньовенними одноразовими дозами 60мг/кг і 120мг/кг.

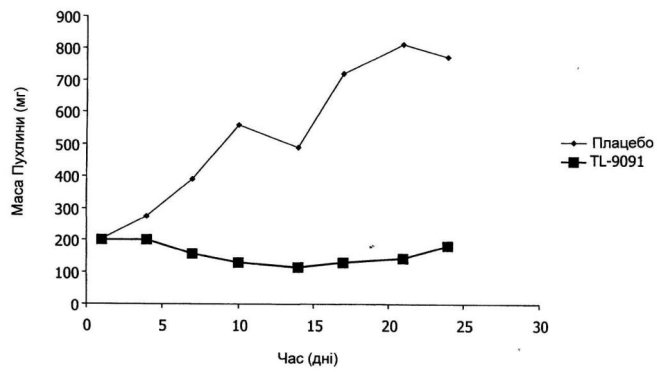
Сполука 9091, таким чином, має потенціал як безпечний і ефективний протипухлинний препарат для перорального й внутрішньовенного застосування.



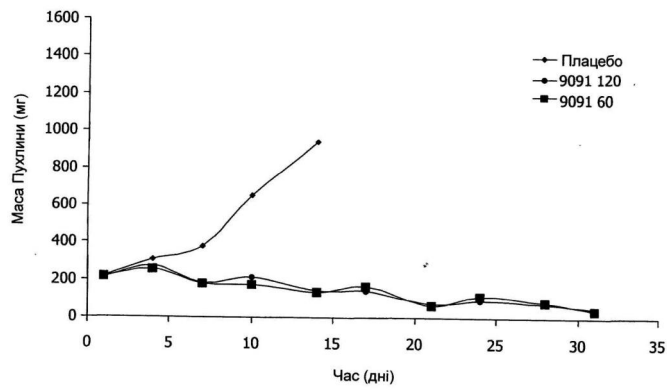
Фіг. 1



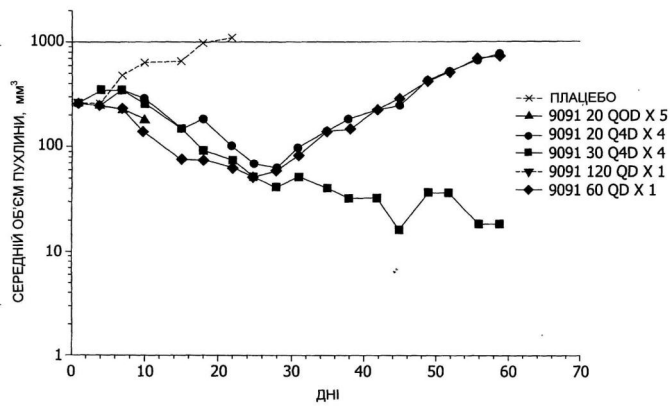
Фіг. 2



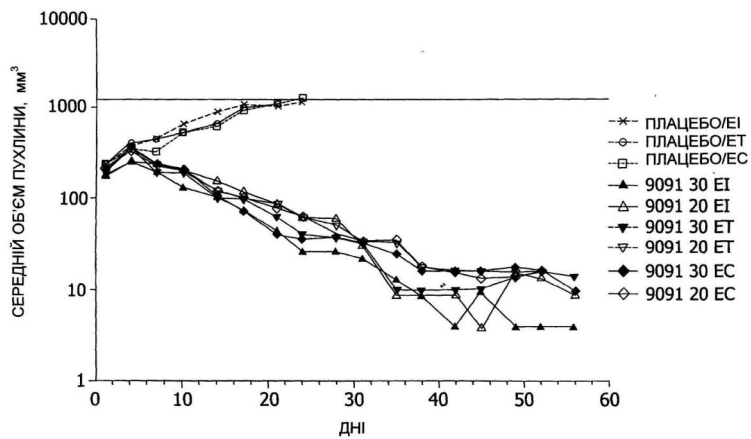
Фіг. 3



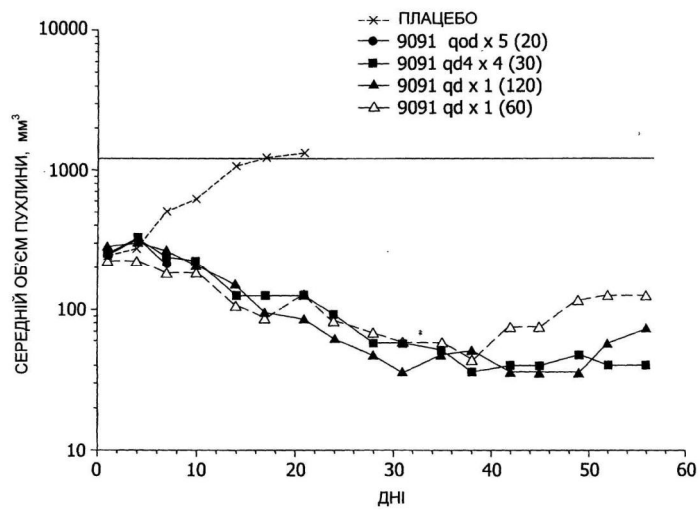
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7