



MD/EP 3395820 T2 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3395820 (13) T2

(51) Int. Cl: C07D 515/22 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61K 31/4995 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

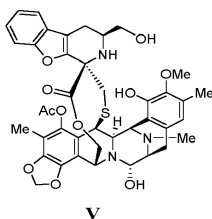
(21) Numărul de depozit: e 2018 1216 (22) Data de depozit: 2018.04.27 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18382287.3, 2018.04.27 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3395820, 2019.05.15 (31) Numărul cererii prioritare: 17382228; 17382497 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.04.27; 2017.07.26 (33) Țara cererii prioritare: EP; EP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2019, 2019.10.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 20/2019, 2019.05.15 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2019, 2019.01.31
(71) Solicitant: Pharma Mar, S.A., ES (72) Inventatori: CUEVAS MARCHANTE Maria del Carmen, ES; FRANCESCH SOLLOSO Andres, ES; MARTINEZ BARRASA Valentin, ES (73) Titular: Pharma Mar, S.A., ES (74) Mandatar autorizat: MARGINE Ion	

(54) Compuși antitumorali

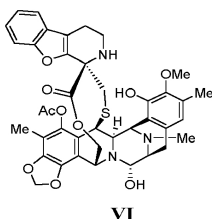
(57) Rezumat:

1

Un compus cu formula generală V sau VI, destinat utilizării în tratamentul cancerului.



V



VI

2

Revendicări: 15
Figuri: 17

MD/EP 3395820 T2 2019.10.31

(54) ANTITUMORAL COMPOUNDS**(57) Abstract:**

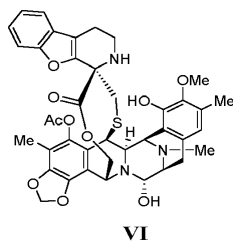
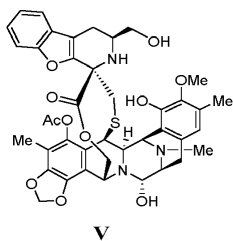
1

A compound of general formula V or VI,
for use in the treatment of cancer.

2

Claims: 15

Fig.: 17

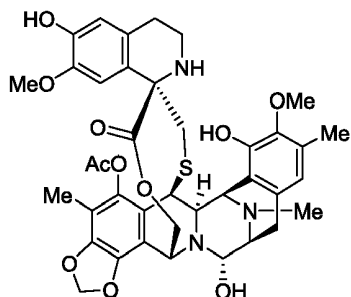


Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

- Prezenta invenție se referă la analogi de sinteză de ecteinascidin, în special de ecteinascidin 736 (ET-736), compoziții farmaceutice care îi conțin, procedee pentru fabricarea acestora și utilizarea acestora ca agenți antitumorali.

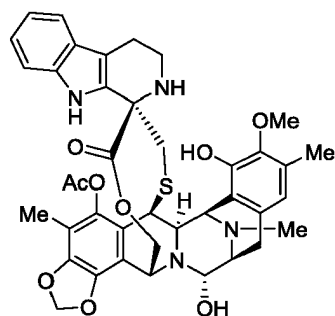
STADIUL TEHNICII

- Ecteinascidinele sunt agenți antitumorali foarte puternici, izolați din tunicieri marini *Ecteinascidia turbinata*. Unul dintre acești compuși, ET-743 are formula:



- fiind folosit ca medicament anticancer, cu denumirea internațională neprotejată (INN) trabectedin, pentru tratamentul pacienților cu sarcom de țesut moale avansat și metastazic (STS) după eșecul antraciclinelor și fosfamidei sau care nu sunt potriviți pentru a primi astfel de agenți și pentru tratamentul cancerului ovarian sensibil la platină recidivat, în combinație cu doxorubicina lipozomală pegilată.

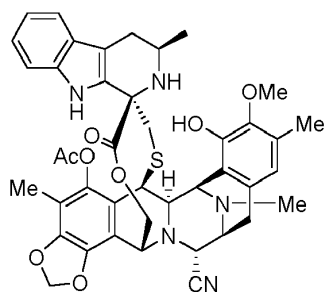
- Ecteinascidin 736 (ET-736) a fost descoperit întâi de către Rinehart și caracteristici de unitate de tetrahidro- β -carbolină în locul unității de tetrahidroizochinolină se găsesc mai uzual în compușii de ecteinascidin izolați din surse naturale; Vezi de exemplu Sakai și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, vol. 89, 11456-11460.

**ET-736**

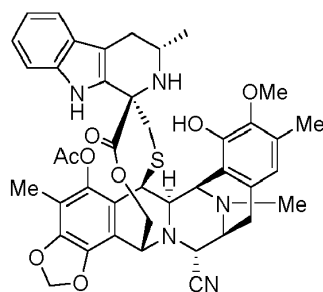
- Brevetul US nr. 5149804 descrie Ecteinascidin 736 (ET-736), izolat din Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata* și structura sa. ET-736 protejează *in vivo* șoarecii la concentrații foarte scăzute împotriva limfomului P388, melanomului B16 și carcinomului pulmonar Lewis.

- WO03014127 descrie diverși analogi sintetici ai ET-736 și activitatea citotoxică a acestora împotriva celulelor tumorale. În special, WO03014127 descrie compuși **A** până la **D** împreună cu activitatea citotoxică a acestora împotriva unui număr de celule canceroase.

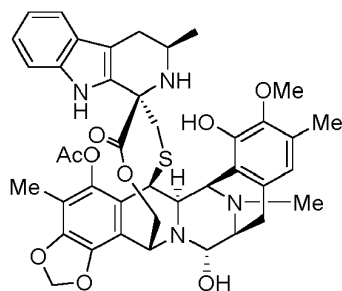
4



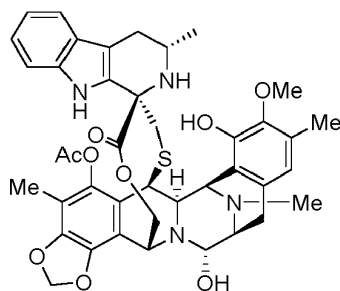
A



B

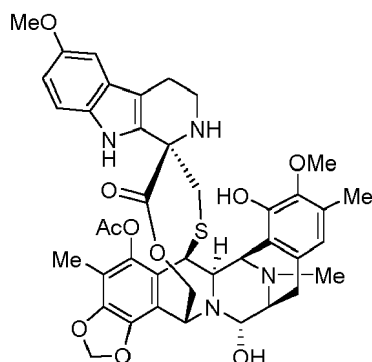


C



D

- 5 Un alt compus descris în această cerere de brevet, **PM01183**, este în prezent în experimente clinice pentru tratamentul cancerului. **PM01183** are următoarea structură chimică:



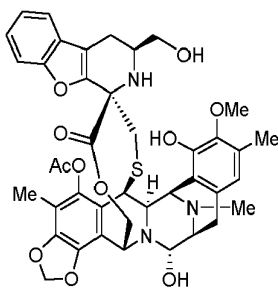
- 10 **PM01183** a demonstrat o activitate foarte puternică *in vitro* împotriva liniilor celulare de tumori solide și nesolide, precum o activitate semnificativă *in vivo* în diverse linii celulare de tumori umane xenogrefate la șoareci, precum cele pentru cancer de sân, de rinichi și ovarian. **PM01183** exercită efectele sale anticancer prin modificarea covalentă de stopare a fazei S și apoptoză în celulele canceroase.

- 15 WO2011147828 descrie procedee de preparare a analogilor de ecteinascidin care acționează ca agenți anticancer.

- 20 Cu toate rezultatele pozitive obținute în aplicațiile clinice în chimioterapie, cercetarea în domeniul compușilor de ecteinascidin este încă deschisă la identificarea de compuși noi cu caracteristici optime ale activității, ale selectivității tumorilor, cu o toxicitate sistemică redusă și/sau proprietăți farmacocinetice îmbunătățite.

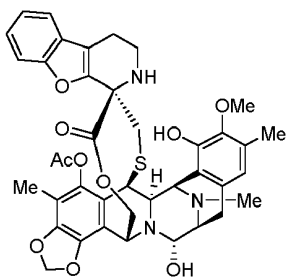
DESCRIEREA PE SCURT A INVENȚIEI

- 25 Într-un prim aspect al prezentei invenții este furnizat un compus cu formula **V** sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic:



V.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții este furnizat un compus cu formula **VI** sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic:



VI.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizată o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus conform prezentei invenții și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizată o formă de dozare care cuprinde o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, sunt furnizate un compus, o compoziție farmaceutică sau o formă de dozare conform prezentei invenții pentru utilizare ca medicament.

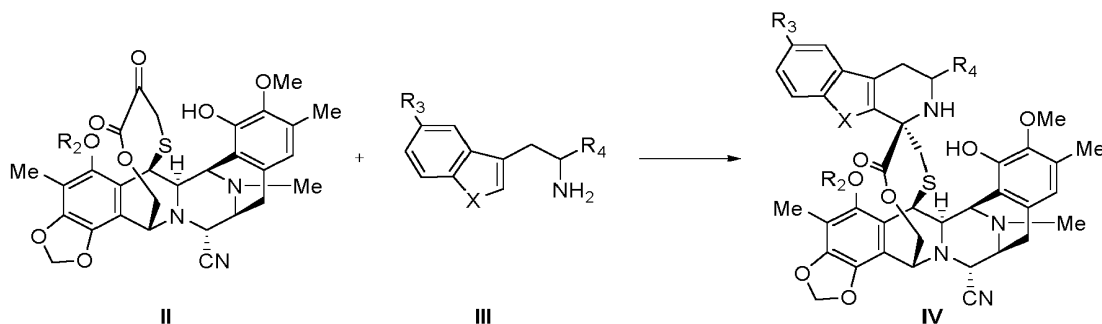
Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, sunt furnizate un compus, o compoziție farmaceutică sau o formă de dozare conform prezentei invenții pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizată utilizarea compusului, compoziției farmaceutice sau formei de dozare conform prezentei invenții pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului. În continuare este descrisă o metodă pentru prevenirea sau tratamentul cancerului, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente de compus conform prezentei invenții sau administrarea unei cantități eficiente de compoziție farmaceutică conform prezentei invenții sau administrarea unei cantități eficiente de formă de dozare conform prezentei invenții la un pacient care necesită aceasta, în special un om.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizată utilizarea unui compus conform prezentei invenții în prepararea unui medicament preferabil pentru tratamentul cancerului.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizat un kit care cuprinde o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic de compus conform prezentei invenții și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Kitul este pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Încă într-un alt aspect al prezentei invenții, este furnizat un procedeu pentru obținerea compusului cu formula **V** sau a unei sări sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic sau compusul cu formula **VI** sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic; care cuprinde etapa de reacție a compusului cu formula **II** cu un compus cu formula **III** pentru a se obține un compus cu formula **IV**:



in care:

X este -O-;

R₂ este acetyl;

R₃ este hidrogen;

R₄ este ales dintre hidrogen sau -CH₂OH.

Procedeul poate include etapa suplimentară de înlocuire a grupării ciano în compusul cu formula IV cu o grupare hidroxi pentru a se obține un compus cu formula V sau VI.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1. Evaluarea diametrului total al tumorii la tumorile HT1080 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 2. Evaluarea volumului tumorii la tumorile MDA-MB-231 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 3. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H460 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 4. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H526 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 5. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H82 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 6. Evaluarea volumului tumorii la tumorile A2780 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 7. Evaluarea volumului tumorii la tumorile HGC27 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S.

Figura 8. Evaluarea diametrului total al tumorii la tumorile HT1080 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 9. Evaluarea volumului tumorii la tumorile MDA-MB-231 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 10. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H460 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 11. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H526 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 12. Evaluarea volumului tumorii la tumorile H82 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 13. Evaluarea volumului tumorii la tumorile A2780 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 14. Evaluarea volumului tumorii la tumorile HGC27 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32.

Figura 15. Evaluarea volumului tumorii la tumorile PC-3 la șoareci tratați cu placebo și 39-S.

Figura 16. Evaluarea volumului tumorii la tumorile DU-145 la șoareci tratați cu placebo și 39-S.

Figura 17. Evaluarea volumului tumorii la tumorile 22Rv1 la șoareci tratați cu placebo și 39-S.

DESCRIERE DETALIATĂ A FORMELOR DE REALIZARE PREFERATE

Cele ce urmează se aplică la toate aspectele prezentei invenții:

Termenii "sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic" și "ester" se referă la oricare sare sau ester acceptabil din punct de vedere farmaceutic care, după administrarea la pacient care este capabil să asigure (direct sau indirect) un compus așa cum s-a descris aici. Totuși, se va aprecia că sărurile neacceptabile din punct de vedere farmaceutic de asemenea intră în sfera de aplicare a invenției întrucât acestea pot fi utile în prepararea sărurilor acceptabile din punct de vedere farmaceutic. Prepararea sărurilor poate fi realizată prin procedee cunoscute în domeniu.

De exemplu, sărurile acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale compușilor furnizate aici sunt preparate din compuși înrudiți, care conțin un radical bazic sau acid, prin procedee chimice convenționale. În general, astfel de săruri sunt, de exemplu, preparate prin reacția acidului sau bazei libere ale acestor compuși cu o cantitate stoichiometrică de bază sau acid corespunzător în apă sau într-un solvent organic sau într-un amestec al ambelor. În general, sunt preferate medii neapoase precum eter, acetat de etil, etanol, 2-propanol sau acetonitril. Exemple de săruri de adiție cu acid includ săruri de adiție de acid mineral precum, de exemplu, clorhidrat, bromhidrat, iodhidrat, sulfat, azotat, fosfat și săruri de adiție de acid organic precum, de exemplu, acetat, trifluoroacetat, maleat, fumarat, citrat, oxalat, succinat, tartrat, malat, mandelat, metansulfonat și *p*-toluensulfonat. Exemple de săruri de adiție cu alcalii includ săruri anorganice precum, de exemplu, săruri de sodiu, potasiu, calciu și amoniu și săruri alcaline organice precum, de exemplu, săruri de etilendiamină, etanolamină, *N,N*-dialchilenetanolamină, trietanolamină și aminoacizi bazi.

Compușii invenției pot fi în formă cristalină sau amorfă fie compuși liberi fie solvați (de exemplu, hidrați) și toate formele sunt destinate a aparține sferei de aplicare a prezentei invenții. Metodele de solvatare sunt în general cunoscute în domeniu.

Este posibil stereoisomerism cu privire la atomii de carbon asimetrici cu stereochimie nespecificată, prin urmare, în asemenea cazuri, atomii de carbon asimetrici pot avea configurație (*R*) sau (*S*). Toți diastereomerii generați de o configurație specifică a unor asemenea atomi de carbon asimetrici împreună cu ceilalți atomi de carbon asimetrici prezenți în moleculă și amestecuri ale acestora, sunt considerați a fi în sfera de aplicare a prezentei invenții. Stereoisomerismul la dubla legătură (izomerism geometric) este de asemenea posibil, prin urmare în unele cazuri molecula ar putea exista ca (*E*)-izomer sau (*Z*)-izomer. Dacă molecula conține mai multe legături duble, fiecare legătură dublă va avea stereoisomerismul său propriu, care ar putea fi același sau diferit față de stereoisomerii celorlalte legături duble ale moleculei. Mai mult, compușii menționați aici pot exista ca atropoizomeri. Stereoisomerii unici inclusiv diastereoisomerii, izomerii geometrici și atropoizomerii compușilor menționați aici și amestecurile acestora intră în sfera de aplicare a prezentei invenții.

În plus, compușii menționați aici pot exista în forme marcate izotopic. Toate sărurile, esterii și formele marcate izotopic acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale compușilor menționați aici și amestecurile acestora, sunt considerate în sfera de aplicare a prezentei invenții.

Pentru a asigura o descriere mai concisă, unele din expresiile cantitative date aici nu sunt calificate cu termenul "circa". Se înțelege că, dacă termenul "circa" este utilizat explicit sau nu, fiecare cantitate dată aici se înțelege că se referă la valoarea dată reală și se înțelege de asemenea că se referă la aproximarea unei astfel de valori date care ar putea fi în mod rezonabil dedusă de un specialist în domeniu, inclusiv echivalenți și aproximări datorită condițiilor experimentale și/sau de măsurare pentru asemenea valoare dată.

O caracteristică importantă a compușilor descriși mai sus constă în bioactivitatea acestora și în particular activitatea citotoxică a acestora. În această privință, s-a găsit în mod surprinzător că acești compuși ai prezentei invenții prezintă o activitate antitumorală îmbunătățită, așa cum se arată în Exemplele 4 și 6 până la 8.

Intr-o altă variantă a prezentei invenții, este furnizată o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus conform prezentei invenții și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Exemple ale formei de administrare includ fără limitare calea orală, topică, parenterală, sublinguală, rectală, vaginală, oculară și intranazală. Administrarea parenterală include injecții subcutanate, injecție intravenoasă, intramusculară, intrasternală sau tehnici de perfuzie. Preferabil compozițiile sunt administrate parenteral. Compozițiile farmaceutice ale invenției pot fi formulate astfel încât un compus conform prezentei invenții să fie bioaccesibil prin administrarea compoziției la un animal, preferabil oameni. Compozițiile pot avea forma de una sau mai multe unități de dozare, în care de exemplu, un comprimat poate fi o singură unitate de dozare și un recipient de compus conform prezentei invenții poate conține compusul sub formă de lichid sau sub formă de aerosol și poate deține o singură sau o multitudine de unități de dozare.

Purtătorul sau vehiculul acceptabil din punct de vedere farmaceutic poate fi sub formă de particule, astfel încât compozițiile sunt, de exemplu, sub formă de comprimat de pulbere. Purtătorul(ii) poate fi lichid, cu compozițiile fiind, de exemplu, un sirop oral sau un lichid

injectabil. În plus, purtătorul(ii) poate fi gazos sau lichid astfel încât să se asigure o compoziție de aerosol utilă, de exemplu în administrarea cu inhalare. Pot fi utilizate de asemenea pulberi pentru forme de dozare de inhalare. Termenul "purtător" se referă la un diluant, adjuvant sau excipient, cu care compusul conform prezentei invenții este administrat. Astfel de purtători farmaceutici pot fi lichide, precum apă și uleiuri incluzând cele ca petrol, uleiuri animale, cele de origine vegetală sau de sinteză, precum ulei de arahide, ulei de soia, ulei mineral, ulei de susan și alții asemenea. Purtătorii pot fi salini, gumă acacia, gelatină, pastă de amidon, talc, keratină, silice coloidală, uree, dizaharide și alții asemenea. În plus, pot fi utilizați agenții auxiliari, de stabilizare, de îngroșare, de lubrifiere și de colorare. Într-o variantă, când se administrează la un animal, compușii și compozițiile conform prezentei invenții și purtătorii acceptabili din punct de vedere farmaceutic sunt sterili. Apa este un purtător preferat când compușii conform prezentei invenții sunt administrați intravenos. Soluțiile saline și soluțiile apoase de dextroză și glicerol pot fi de asemenea folosite ca purtători lichizi, în special pentru soluțiile injectabile. Purtătorii farmaceutici adecvați includ de asemenea excipienți precum amidon, glucoză, lactoză, zaharoză, gelatină, malț, orez, făină, cretă, silica gel, stearat de sodiu, monostearat de glicerol, talc, clorură de sodiu, lapte praf degresat, glicerol, propilenglicol, apă, etanol și alții asemenea. Compozițiile prezente, dacă se dorește, pot conține de asemenea cantități minore de agenți de umectare sau emulsifiere sau agenți de tamponare pH.

În cazul administrării orale, compoziția este preferabil în formă solidă sau lichidă, în care formele semisolidă, semilichidă, suspensie și gel sunt incluse în cadrul formelor considerate fie solide fie lichide.

Sub formă de compoziție solidă pentru administrare orală, compoziția poate fi formulată ca pulbere, granule, comprimat, pilulă, capsulă, gumă de mestecat, cașetă sau alții asemenea. O astfel de compoziție solidă conține în mod specific unu sau mai mulți diluanți inerți. În plus, pot fi prezenți unu sau mai mulți dintre următorii: lianți precum carboximetilceluloză, etilceluloză, celuloză microcristalină sau gelatină; excipienți precum amidon, lactoză sau dextrine, agenți de dezintegrare precum acid alginic, alginat de sodiu, amidon de porumb și alții asemenea; lubrifianți precum stearat de magneziu; glidanți precum dioxid de siliciu coloidal; agent de îndulcire precum zaharoză sau zaharină; un agent de aromatizare precum mentă, salicilat de metil sau aromă de portocale; și un agent de colorare.

Când compoziția este în formă de capsule (de exemplu, o capsulă de gelatină), aceasta poate conține, în afară de materialele de tipul de mai sus, un purtător lichid precum polietilenglicol, ciclodextrine sau un ulei gras.

Compoziția poate fi sub formă de lichid, de exemplu, un elixir, sirop, soluție, emulsie sau suspensie. Lichidul poate fi util pentru administrare orală sau pentru livrare prin injectare. Când este destinată pentru administrare orală, o compoziție poate cuprinde unu sau mai mulți dintre un agent de îndulcire, conservanți, vopsea/colorant și substanță de ameliorare a aromei. Într-o compoziție pentru administrare prin injectare, pot fi de asemenea incluși unu sau mai mulți dintre un surfactant, conservant, agent de umectare, agent de dispersare, agent de suspendare, substanță tampon, stabilizator și agent izotonic.

Calea de administrare preferată este administrarea parenterală incluzând, dar fără să se limiteze la calea intradermică, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă, subcutanată, intranasală, epidurală, intracerebrală, intraventriculară, intratecală, intravaginală sau transdermică. Modul de administrare preferat este lăsat la discreția practicianului și va depinde în parte pe situsul bolii (cum ar fi situsul cancerului). Într-o variantă mai preferată, compușii conform prezentei invenții sunt administrați intravenos. Se preferă a se utiliza timp de perfuzie de până la 24 ore, mai preferabil 1 până la 12 ore, cu 1 până la 6 ore fiind cel mai preferabil. Sunt în special de dorit timpi de perfuzie de scurtă durată care permit ca tratamentul să fie efectuat fără a rămâne peste noapte în spital. Totuși, perfuzia poate fi de 12 până la 24 ore sau chiar mai mult dacă este necesar. Perfuzia poate fi efectuată la intervale adecvate, de exemplu, 1 până la 4 săptămâni.

Compozițiile lichide ale invenției, dacă acestea sunt soluții, suspensii sau oricare altă formă, pot include de asemenea unu sau mai multe dintre următoarele: diluanți sterili precum apă pentru injectare, soluție salină, preferabil salină fiziologică, soluție Ringer, clorură de sodiu izotonică, uleiuri grase (sau fixe) precum mono sau digliceride sintetice, polietilen glicoli, glicerină sau alți solvenți; agenți antibacterieni precum alcool benzilic sau metil paraben; și agenți pentru ajustarea tonicității precum clorură de sodiu sau dextroză. O compoziție parenterală poate fi închisă într-o fiolă, o seringă de unică folosință sau un flacon cu doză multiplă din sticlă, plastic sau alt material. Soluția salină fiziologică este un adjuvant preferat.

Cantitatea de compus conform prezentei invenții care este eficace în tratamentul unei anumite tulburări sau afecțiuni va depinde de natura tulburării sau afecțiunii și poate fi determinată prin tehnici clinice standard. În plus, testele *in vitro* sau *in vivo* pot fi opțional folosite

penru a ajuta la identificarea intervalelor optime de dozare. Doza precisă de folosit în compoziții va depinde de asemenea de calea de administrare și de gravitatea bolii sau tulburării și trebuie să fie stabilită în conformitate cu hotărârea medicului și circumstanțele fiecărui pacient.

5 Compozițiile cuprind o cantitate eficace de compus al prezentei invenții astfel încât va fi obținută o dozare adecvată. Dozarea corectă a compușilor va varia conform cu o anumită formulare, modul de aplicare și situsul său particular, gazda și boala care este tratată, de exemplu, cancer și, dacă da, ce tip de tumoare. Alți factori precum vârsta, greutatea corpului, sexul, dieta, timpul de administrare, rata de excreție, starea gazdei, combinațiile de medicamente, reacțiile sensibile și severitatea bolii trebuie să fie luate în considerare. Administrarea poate fi efectuată
10 continuu sau periodic în cadrul dozei maxime tolerate.

În mod specific, cantitatea este cel puțin circa 0,01% de compus al prezentei invenții și poate cuprinde cel puțin 80% în greutate din compoziție. Când este destinat pentru administrare orală, această cantitate poate fi variată în intervalul de la circa 0,1% până la circa 80% în greutate din compoziție. Compozițiile orale preferate pot cuprinde de la circa 4% până la circa 50% de
15 compus al prezentei invenții în greutate din compoziție.

Compozițiile preferate ale prezentei invenții sunt preparate astfel încât o unitate de dozare parenterală conține de la circa 0,01% până la circa 10 % în greutate compus al prezentei invenții. Mai preferabil unitatea de dozare parenterală conține circa 0,5 % până la circa 5 % în greutate de compus al prezentei invenții.

20 Pentru administrare intravenoasă, compoziția este accesibilă pentru doze de la circa 0,1 mg/kg până la circa 250 mg/kg de greutate corp animal, preferabil de la circa 0,1 mg/kg și circa 20 mg/kg de greutate corp animal și mai preferabil de la circa 1 mg/kg până la circa 10 mg/kg de greutate corp animal.

Compusul prezentei invenții, poate fi administrat pe oricare cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injecție bolus, prin absorbție prin tubări epiteliale sau mucocutanate.

25 În variantele specifice, poate fi de dorit să se administreze unu sau mai mulți compuși ai prezentei invenții sau compoziții local pe suprafața care necesită tratament. Într-o variantă, administrarea poate fi prin injecție directă pe loc (sau primul situs) de cancer, tumoare sau țesut neoplazic sau preneoplazic.

30 Poate fi folosită de asemenea administrarea pulmonară, de exemplu, prin utilizarea unui inhalator sau nebulizator și formularea cu un agent de aerosolizare sau prin perfuzie într-un surfactant pulmonar fluorocarbonat sau sintetic. În anumite variante, compusul prezentei invenții poate fi formulat ca supozitor, cu lianți și purtători tradiționali precum trigliceride.

35 Compozițiile prezente pot lua formă de soluții, suspensii, emulsii, tablete, pilule, pelete, capsule, capsule conținând lichide, pulberi, formulări cu eliberare susținută, supozitoare, emulsii, aerosoli, spray, suspensii sau oricare altă formă adecvată pentru utilizare. Alte exemple de purtători farmaceutici adecvați sunt descrise în "Remington's Pharmaceutical Sciences" al lui E. W. Martin.

40 Compozițiile farmaceutice pot fi preparate utilizând metodologia bine cunoscută în domeniul farmaceutic. De exemplu, o compoziție destinată a fi administrată prin injecție poate fi preparată prin combinarea unui compus al prezentei invenții cu apă sau alt diluant fiziologic adecvat, precum soluție salină tamponată cu fosfat, astfel încât să se formeze o soluție. Poate fi adăugat un surfactant pentru a facilita formarea unei soluții sau suspensii omogene.

45 Compozițiile preferate conform prezentei invenții includ:

- compoziții farmaceutice care cuprind un compus al prezentei invenții și o dizaharidă. În special dizaharidele preferate sunt alese dintre lactoză, trehaloză, zaharoză, maltoză, izomaltoză, celobioză, izozaharoză, izotrehaloză, turanoză, melibioză, gentiobioză și amestecurile acestora.
- compoziții farmaceutice liofilizate care cuprind un compus al prezentei invenții și o dizaharidă. În special dizaharidele preferate sunt alese dintre lactoză, trehaloză, zaharoză, maltoză, izomaltoză, celobioză, izozaharoză, izotrehaloză, turanoză, melibioză, gentiobioză și amestecurile acestora.

50

55 Raportul dintre substanța activă și dizaharidă în variantele prezentei invenții este determinat în conformitate cu solubilitatea dizaharidei și, când formularea este liofilizată uscat, de asemenea în conformitate cu capacitatea de uscare prin înghețare a dizaharidei. Se prevede că acest raport substanță activă:dizaharidă (greut/greut) poate fi circa 1:10 în unele variante, circa 1:20 în alte variante, circa 1:50 încă în alte variante. Se prevede că alte variante au astfel de rapoarte în intervalul de la circa 1:5 până la circa 1:500 și încă în alte variante au astfel de rapoarte în intervalul de la circa 1:10 până la circa 1:500.

Compoziția care cuprinde un compus al prezentei invenții poate fi liofilizată. Compoziția care cuprinde un compus al prezentei invenții este uzual prezentată într-un flacon care conține o cantitate menționată de asemenea compus.

5 S-a găsit că compușii prezentei invenții și compozițiile prezentei invenții sunt în special eficace în tratamentul cancerului. Prezenta invenție furnizează un compus sau compoziție pentru utilizare ca medicament. Prezenta invenție furnizează un compus sau compoziție pentru utilizare în tratamentul cancerului și mai preferabil cancerul ales dintre cancer pulmonar, inclusiv cancer pulmonar fără celule mici și cancer pulmonar cu celule mici, cancer de colon, cancer de sân, cancer de pancreas, sarcom, cancer ovarian și cancer gastric.

10 Astfel, compușii și compozițiile conform prezentei invenții sunt utili pentru inhibarea multiplicării sau proliferării, unei celule tumorale sau celule canceroase sau pentru tratarea cancerului la un animal.

Compușii și compozițiile conform prezentei invenții prezintă o activitate excelentă în tratamentul cancerelor precum cancerul pulmonar inclusiv cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de colon, cancerul de san, cancerul de pancreas, sarcom, cancerul ovarian și cancerul gastric. Cancerelor cele mai preferate sunt alese dintre cancerul pulmonar inclusiv cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de san, cancerul de pancreas și cancerul colorectal.

20 În cererea prezentă, prin "cancer" se înțelege că include tumori, neoplazii și oricare altă boală malignă având drept cauză țesuturi maligne sau celule.

Termenul "tratare", așa cum se utilizează aici, dacă nu se indică altfel, înseamnă reversia, atenuarea, ameliorarea sau inhibarea progresului bolii sau afecțiunii la care se aplică astfel de termen sau unu sau mai multe simptome al unei asemenea tulburări sau afecțiuni. Termenul "tratament", așa cum se utilizează aici, dacă nu se indică altfel, se referă la actul de tratare ca "tratare" care este definit imediat mai sus.

Compușii și compozițiile conform prezentei invenții pot fi administrați la un animal care de asemenea a suferit o intervenție chirurgicală ca tratament pentru cancer. Într-o variantă a prezentei invenții, metoda adițională de tratament este terapia cu radiații.

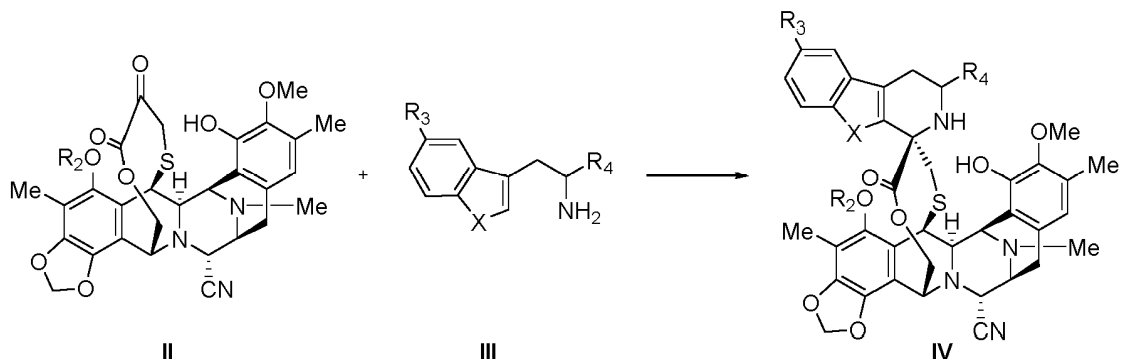
30 Într-o variantă specifică a prezentei invenții, compusul sau compoziția conform prezentei invenții este administrat în același timp cu terapia cu radiații. Într-o altă variantă specifică, terapia cu radiații este administrată înainte sau ulterior administrării compusului sau compoziției prezentei invenții, preferabil cel puțin cu o ore, trei ore, cinci ore, 12 ore, o zi, o săptămână, o lună, mai preferabil câteva luni (de exemplu, până la trei luni) înainte sau ulterior administrării unui compus sau compoziție a prezentei invenții.

35 Poate fi utilizat oricare protocol de terapie cu radiații în funcție de tipul de cancer ce urmează a fi tratat. De exemplu, dar fără limitare, se poate administra radiație cu raze X; în particular, energie mare de megavoltaj (radiații cu energie mai mare de 1 MeV) poate fi utilizată pentru tumori adanci și fascicul de electroni și radiație de ortovoltaj cu raze X se pot utiliza pentru cancere de piele. Pot fi de asemenea administrați radioizotopi care emit raze gama precum izotopii radioactivi de raniu, cobalt și alte elemente.

40 Într-o altă variantă a prezentei invenții, este furnizat un kit care cuprinde o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic de compus conform prezentei invenții și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

45 Într-o variantă, kitul conform cu această variantă este pentru utilizare în tratamentul cancerului și mai preferabil unui cancer ales dintre cancer pulmonar, inclusiv cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de colon, cancerul de sân, cancerul de pancreas, sarcom, cancerul ovarian și cancerul gastric.

50 Într-o altă variantă a prezentei invenții, este furnizat un procedeu pentru obținerea unui compus cu formula **V** sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic care cuprinde etapa de reacție a compusului cu formula **II** cu un compus cu formula **III** pentru a se obține un compus cu formula **IV**:

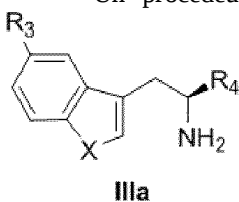


- 5 in care:
 X este -O-;
 R₂ este acetil;
 R₃ este hidrogen;
 R₄ este -CH₂OH.

10 Intr-o variantă mai preferată, procedeul cuprinde în plus etapa de înlocuire a grupării ciano in compusul cu formula **IV** cu o grupare hidroxi pentru a se obține un compus cu formula **I**.

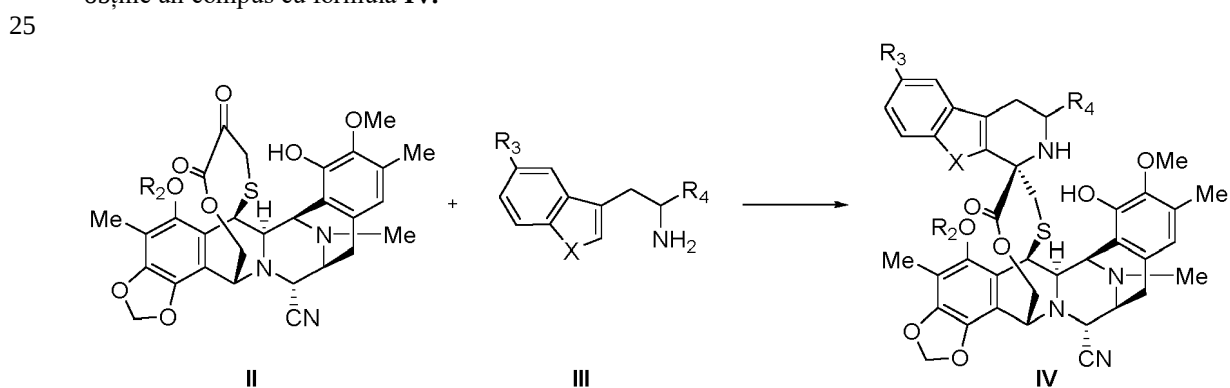
Procedee preferate conform prezentei invenții includ:

- Un procedeu in care compusul cu formula **III** este un compus cu formula **IIIa**:



- 15 in care
 X este -O-;
 R₃ este hidrogen; și
 R₄ este -CH₂OH.

20 Intr-o altă variantă a prezentei invenții, este furnizat un procedeu pentru obținerea unui compus cu formula **VI** sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic, care cuprinde etapa de reacție a compusului cu formula **II** cu un compus cu formula **III** pentru a se obține un compus cu formula **IV**:



- 30 in care:
 X este -O-;
 R₂ este acetil;
 R₃ este hidrogen;
 R₄ este hidrogen.

5

Compusul **1** a fost preparat asa cum s-a descris in Exemplul 20 de la WO 01/87895.

Exemplul 1.

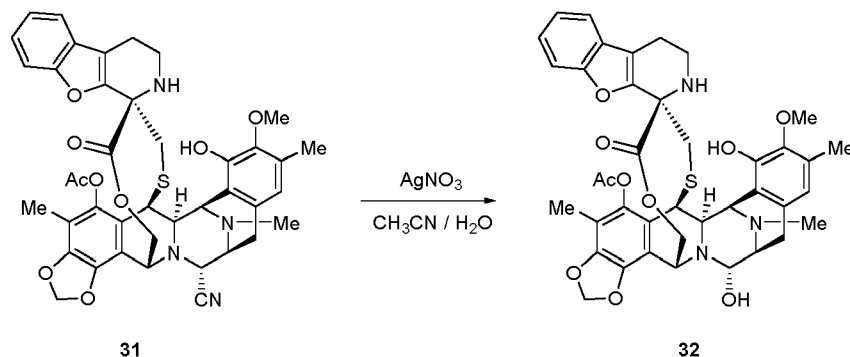
Chemical reaction scheme showing the synthesis of compound **31** from compound **1** and reagent **30** (2-(benzofuran-2-yl)ethan-1-amine hydrochloride) under conditions TCT, CH₃CN.

La o soluție de compus **1** (2,0 g, 3,21 mmol) în acetonitril (200 mL, 0,01 M) s-a adăugat clorhidrat de 2-benzofuran-3-il-etilamină (**30**) (1,90 g, 9,65 mmol, Sigma Aldrich) și clorură cianurică (TCT) (200 mg, 10%). Amestecul de reacție s-a agitat la 85°C pentru 24 h și apoi s-a adăugat soluție apoasă saturată de NaHCO₃ și amestecul s-a extras cu CH₂Cl₂. Straturile organice combinate s-au uscat pe Na₂SO₄ anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat în vid. După cromatografie rapidă (Hexan:AcOEt, de la 9:1 până la 1:9) se obține compusul **31** (1,95 g, 79%).

Rf= 0,5 (Hexan:AcOEt, 1:1).

25 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,36 (m, 2H), 7,19-7,10 (m, 2H), 6,64 (s, 1H), 6,20 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 6,05 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,05 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,33-4,24 (m, 2H), 4,23-4,16 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,49-3,38 (m, 2H), 3,28-3,21 (m, 1H), 3,06-2,78 (m, 5H), 2,57-2,50 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,21 (m, 3H), 2,08 (s, 3H).

ESI-MS m/z : 765,3 (M+H)⁺.

30 **B)**

35 La o soluție de compus **31** (380 mg, 0,49 mmol) în CH₃CN:H₂O (1,39:1, 25 mL, 0,015 M) s-a adăugat AgNO₃ (1,30 g, 7,45 mmol). După 5 h la 23°C, s-a adăugat un amestec 1:1 de soluții apoase saturate de NaCl și NaHCO₃, s-a agitat pentru 15 min, s-a diluat cu CH₂Cl₂, s-a agitat pentru 5 min și s-a extras cu CH₂Cl₂. Straturile organice combinate s-au uscat pe Na₂SO₄.

anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat in vid. Reziduul obținut s-a purificat prin cromatografie rapidă ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, de la 99:1 până la 85:15) pentru a se obține compusul **32** (175 mg, 47%).

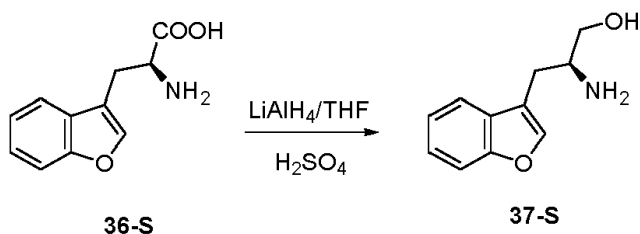
Rf= 0,40 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,35 (ddd, J = 10,7, 7,6, 1,1 Hz, 2H), 7,14 (dtd, J = 19,7, 7,3, 1,3 Hz, 2H), 6,65 (s, 1H), 6,16 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 6,01 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 5,75 (s, 1H), 5,15 (dd, J = 11,5, 1,2 Hz, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,48 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,44 (s, 1H), 4,20-4,06 (m, 2H), 3,81 (s, 1H), 3,50 (d, J = 18,8 Hz, 1H), 3,30 (ddd, J = 12,6, 7,9, 5,1 Hz, 1H), 3,22 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 2,99 (d, J = 17,9 Hz, 1H), 2,84 (dd, J = 19,2, 12,0 Hz, 3H), 2,59-2,49 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,21-2,14 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 171,2, 168,7, 154,4, 150,0, 147,9, 145,5, 142,9, 140,9, 140,8, 131,3, 129,0, 127,7, 123,7, 122,2, 121,2, 120,8, 118,9, 118,3, 115,5, 113,5, 111,7, 101,7, 82,1, 62,7, 61,7, 60,3, 57,8, 57,4, 55,9, 55,0, 42,2, 41,3, 39,7, 38,2, 29,7, 23,7, 21,3, 20,6, 15,9, 9,7, ESI-MS m/z : 738,6 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$)⁺.

(+)-HR-ESI-TOF-MS m/z : 756,2654 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (Calculat pentru $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ 756,2585).

Exemplul 2



20

La o soluție de LiAlH_4 (148 mL, 1,0 M in THF, 148 mmol) la -40°C s-a adăugat cu atenție H_2SO_4 (7,14 mL, 72,9 mmol) și o suspensie de acid (S)-2-amino-3-(benzofuran-3-il) propanoic (**36-S**) (preparat așa cum s-a descris în Tetrahedron Asymmetry 2008, 19, 500-511) (5,54 g, 26,9 mmol) în THF (85 mL, 0,003 M). Amestecul de reacție s-a lăsat să evolueze la 23°C , s-a încălzit la 80°C pentru 3 h și 18 h la 23°C . Amestecul de reacție a fost răcit cu atenție la -21°C cu NaOH 2N până la pH bazic. S-a adăugat AcOEt și amestecul s-a filtrat prin Celite® și s-a spălat cu CH_3OH . Produsul brut a fost concentrat in vid obținându-se compusul **37-S** (3,93 g, >100%).

25

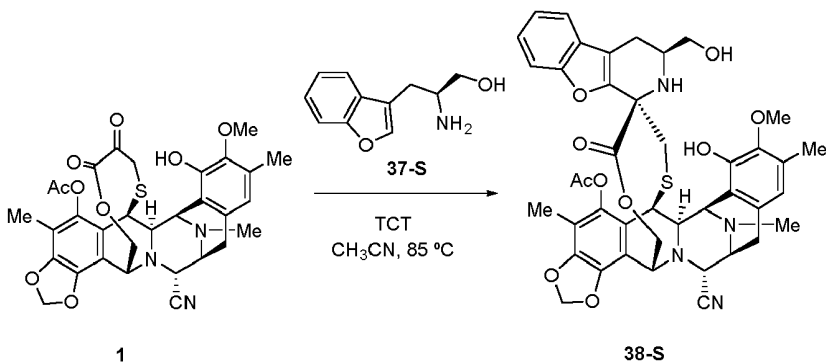
Rf= 0,1 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 4:1).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,67 - 7,62 (m, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,51 - 7,41 (m, 1H), 7,34 - 7,18 (m, 2H), 3,69 - 3,48 (m, 1H), 3,44 (dd, J = 10,8, 6,6 Hz, 1H), 3,18 (dtd, J = 7,4, 6,4, 4,6 Hz, 1H), 2,88 (ddd, J = 14,4, 6,1, 1,0 Hz, 1H), 2,68 (ddd, J = 14,4, 7,5, 0,9 Hz, 1H).

30

Exemplul 3

35 A)



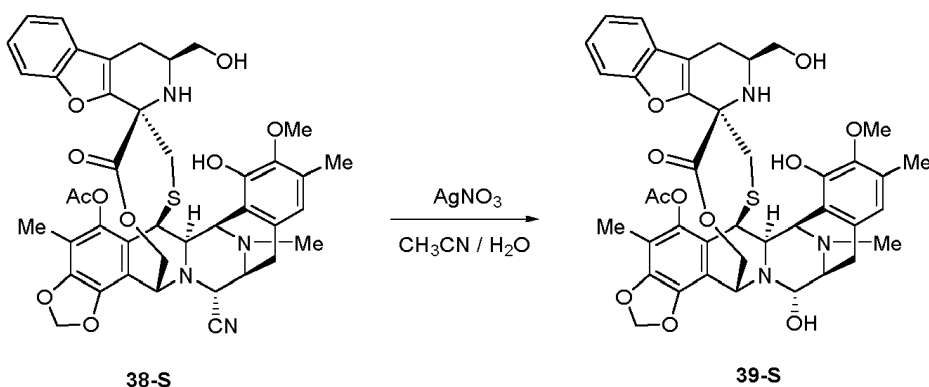
apoașă saturată de NaHCO_3 și amestecul s-a extras cu CH_2Cl_2 . Straturile organice combinate s-au uscat pe Na_2SO_4 anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat în vid. După cromatografie rapidă (Hexan:AcOEt, de la 9:1 până la 1:9) s-a obținut compusul 38-S (750 mg, 69%).

$R_f = 0,25$ (Hexan:AcOEt, 1:1).

- 5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,39 - 7,33 (m, 1H), 7,33 - 7,29 (m, 1H), 7,20 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,4$ Hz, 1H), 7,14 (td, $J = 7,4, 1,0$ Hz, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,21 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 6,06 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 5,74 (s, 1H), 5,08 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 4,58 (s, 1H), 4,37 (s, 1H), 4,32 - 4,23 (m, 2H), 4,19 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,52 - 3,41 (m, 3H), 3,36 - 3,29 (m, 1H), 3,13 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 3,00 - 2,81 (m, 3H), 2,57 (dd, $J = 15,7, 4,9$ Hz, 1H), 2,50 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,31 - 2,25 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,10 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 2,05 (s, 3H).

ESI-MS m/z : 795,2 (M^+).

B)



- La o soluție de compus **38-S** (890 mg, 1,12 mmol) în $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1,39:1, 75 mL, 0,015 M) s-a adăugat AgNO_3 (4,70 g, 28,0 mmol). După 18 h la 23°C , s-a adăugat un amestec 1:1 de soluții apoase saturate de NaCl și NaHCO_3 , s-a agitat pentru 15 min, s-a diluat cu CH_2Cl_2 , s-a agitat pentru 5 min și s-a extras cu CH_2Cl_2 . Straturile organice combinate s-au uscat pe Na_2SO_4 anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat în vid. Reziduul obținut s-a purificat prin cromatografie rapidă ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, de la 99:1 până la 85:15) pentru a se obține compusul **39-S** (500 mg, 57%).

$R_f = 0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1).

- 25 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38 - 7,33 (m, 1H), 7,33 - 7,28 (m, 1H), 7,23 - 7,16 (m, 1H), 7,16 - 7,09 (m, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,18 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 6,03 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,19 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,49 (s, 2H), 4,24 - 4,10 (m, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,54 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 3,49 (d, $J = 2,3$ Hz, 3H), 3,33 (t, $J = 10,1$ Hz, 2H), 3,22 (s, 1H), 2,98 (s, 1H), 2,84 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,62 - 2,53 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,30 - 2,24 (m, 1H), 2,28 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,04 (s, 3H).

- 30 ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ 172,0, 170,7, 156,1, 150,6, 149,9, 147,1, 145,0, 142,4, 142,2, 132,0, 131,4, 128,7, 125,5, 123,8, 122,6, 121,6, 120,1, 116,5, 114,4, 112,3, 103,5, 92,6, 66,0, 65,1, 62,2, 60,4, 59,7, 56,6, 56,1, 54,8, 54,1, 51,6, 44,0, 41,3, 38,3, 30,8, 24,8, 20,6, 16,3, 9,6, ESI-MS m/z : 768,2 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$).

- 35 (+)-HR-ESI-TOF-MS m/z : 768,2652 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$] (Calculat pentru $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ 768,2585)

Exemplul 4. Bioteste *in vitro* pentru detectarea activității antitumorale

- Scopul acestui test este de a evalua activitatea citostatică (capacitatea de a întârzia sau stopa creșterea celulelor tumorale) sau citotoxică (capacitatea de a omorî celulele tumorale) *in vitro* în probele ce sunt testate.

LINII CELULARE

Denumire	N° ATCC	Specii	Țesut	Caracteristici
A549	CCL-185	uman	plămân	carcinom pulmonar (NSCLC)
HT29	HTB-38	uman	colon	adenocarcinom colorectal

Denumire	N° ATCC	Specii	Țesut	Caracteristici
MDA-MB-231	HTB-26	uman	san	adenocarcinom de san
PSN1	CRM-CRL-3211	uman	pancreas	adenocarcinom de pancreas
PC-3	CRL-1435	uman	prostată	adenocarcinom de prostată
22Rv1	CRL-2505	uman	prostată	carcinom de prostată

EVALUAREA ACTIVITĂȚII CITOTOXICE UTILIZÂND TESTE COLORIMETRICE SBR și MTT

5 A fost adaptat un test colorimetric, utilizand reacția sulforodaminei B (SRB) pentru a obține o măsurare cantitativă a creșterii și viabilității celulelor (urmând tehnica descrisă de Skehan și colab. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112). Un alt test colorimetric bazat pe reducerea de bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT) la un formazan purpuriu a fost de asemenea utilizat prntru a evalua activitatea antiproliferativă (urmând tehnica descrisă de Mosmann și colab. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63).

10 Aceste forme de analize folosesc microplăci de cultură cu 96 de godeuri urmând standardele de la American National Standards Institute și Society for Laboratory Automation și Screening (ANSI SLAS 1-2004 (R2012) 10/12/2011. Toate liniile celulare utilizate in acest studiu au fost obținute de la American Type Culture Collection (ATCC) și derivă din diferite tipuri de cancer uman.

15 Celulele A549, HT29, MDA-MB-231 și PSN1 au fost menținute în mediu Eagle modificat de Dulbecco (DMEM) in timp ce celulele PC-3 și 22Rv1 au fost menținute în mediu de la Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Toate liniile celulare au fost suplimentate cu 10% ser fetal de bovină (FBS), 2mM L-glutamină, 100 U/mL penicilină și 100 U/mL streptomycină la 20 37°C, 5% CO₂ și 98% umiditate. Pentru experimente, celulele au fost recoltate din culturi subconfluente utilizand tripsinizare și resuspendate în mediu proaspăt înainte de numărare și placare.

25 Celulele A549, HT29, MDA-MB-231 și PSN1 au fost însămânțate pe plăci de microtitrare cu 96 godeuri, la 5000 celule pe godeu in alicoji de 150 μL și lăsate să se atașeze la suprafața plăcii pentru 18 ore (peste noapte) în mediu fără medicament. După aceasta, o placă martor (netratată) de fiecare linie celulară a fost fixată (așa cum s-a descris mai jos) și utilizată pentru valoarea de referință timp zero. Plăcile de cultură au fost apoi tratate cu compușii de testat (alicoji de 50 μL de soluții 4X stoc în mediu de cultură complet plus 4% DMSO) utilizând zece diluții în serie 2/5 (concentrații variind de la 10 până la 0,003 μg/mL) și culturi triplicate(1% concentrație finală în DMSO). După 72 ore de tratament, a fost măsurat efectul antitumoral 30 utilizând metodologia SRB: pe scurt, celulele au spălate de două ori cu PBS, fixate pentru 15 min în soluție 1% glutaraldehidă la temperatura camerei, clătite de două ori în PBS și colorate în soluție 0,4% SRB pentru 30 min la temperatura camerei. Celulele au fost apoi clătite de câteva ori cu soluție 1% acid acetic și uscate la aer la temperatura camerei. SRB a fost apoi extras în soluție 35 de bază de trizma 10 mM și absorbanta s-a măsurat pe un cititor cu o placă spectrofotometrică automată la 490 nm.

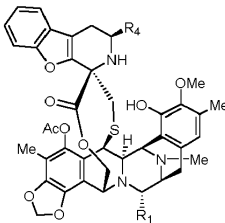
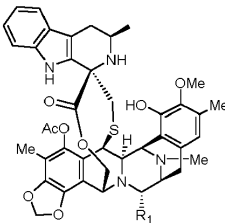
Pe plăcile cu 96 de godeuri s-a însămânțat un număr corespunzător de celule PC-3 și 22Rv1, până s-a atins o densitate finală a celulelor în test variind de la 5000 până la 15000 celule pe godeu in funcție de linia celulară și s-au lăsat să stea în mediul de cultură pentru 24 h la 37°C 40 sub 5% CO₂ și 98% umiditate. Apoi, compușii sau DMSO în mediul de cultură s-au adăugat pentru a atinge un volum final de 200 μL și concentrația compusului dorit într-un interval care acoperă zece diluții seriale 2/5 plecând de la 0,1 μg/mL în 1% (vol/vol) DMSO. In acest moment, un set de "plăci martor la timp zero" tratate cu 1% (vol/vol) DMSO s-au prelucrat cu MTT așa cum este descris mai jos. Restul plăcilor au fost incubate timp de 72h in condițiile de mediu menționate 45 mai sus. Apoi s-au adăugat 50 μL de soluție 1 mg/mL MTT în mediu de cultură la godeuri și s-a incubat pentru 6-8 ore la 37°C pentru a permite generarea cristalelor de formazan. Mediul de cultură a fost apoi îndepărtat și s-au adăugat 100 μL de DMSO pur la fiecare godeu pentru a dizolva produsul de formazan într-o soluție colorată la care absorbanta la 540 nm a fost în final măsurată într-un cititor PolarStar Omega cu microplăci multimarcate (BMG Labtech, Ortenberg, 50 Germany).

Efectele asupra creșterii și supraviețuirii celulelor s-au estimat prin aplicarea algoritmului NCI (Boyd MR și Paull KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91-104).

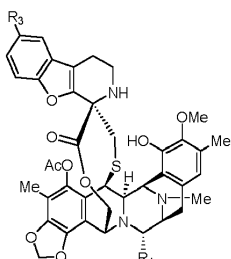
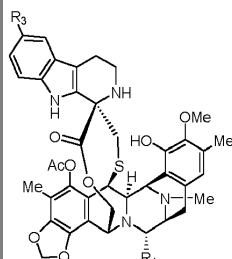
5 Valorile obținute în culturile triplicat au fost montate prin regresie neliniară la o curbă logistică cu patru parametri prin analiză de regresie neliniară. Au fost calculați trei parametri de referință (conform cu algoritmul NCI menționat mai sus) prin interpolare automată a curbelor obținute prin această montare: GI50 = concentrația compusului care produce 50% inhibare a creșterii celulelor, în comparație cu culturile martor; TGI = inhibarea creșterii totale a celulelor (efect citostatic), în comparație cu culturile martor și LC50 = concentrația compusului care produce 50% efect citotoxic uciderea netă a celulelor).

10 Tabelele 1-2 ilustrează datele asupra activității biologice a compușilor prezentei invenții împreună cu activitatea biologică a compușilor de referință. Compușii **C** și **ET-736** nu fac parte din prezenta invenție.

Tabel 1. Activitate biologică (Molar)

Compus					Compus de referință							
												
39-S R ₁ = OH, R ₄ = -CH ₂ OH					C R ₁ = OH							
		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1	PC-3	22Rv1		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1
GI₅₀	39-S	4.84E-09	3.94E-09	3.44E-09	8.02E-09	2.78E-09	4.81E-10	C	2.73E-08	2.08E-08	2.60E-08	3.64E-08
TGI		8.27E-09	6.74E-09	7.13E-09	1.02E-08				6.63E-08	2.34E-08	5.46E-08	4.42E-08
LC₅₀		1.65E-08	>1.27E-07	1.78E-08	1.27E-08				>1.30E-07	>1.30E-07	>1.30E-07	6.50E-08

Tabel 2. Activitate biologică (Molar)

Compus					Compus de referință				
									
32 R1 = OH, R3 = H					ET-736 R1 = OH, R3 = H				
	A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1
GI50	6,88E-09	6,88E-09	4,76E-09	6,09E-09	ET-736	2,25E-08	2,12E-08	2,12E-08	3,97E-08
TGI	>1,32E-08	>1,32E-08	1,05E-08	8,34E-09		4,77E-08	2,25E-08	2,52E-08	5,96E-08
LC50	>1,32E-08	>1,32E-08	>1,32E-08	1,20E-08		>1,32E-07	>1,32E-07	4,77E-08	1,02E-07

Compușii prezentei invenții sunt prezentați ca având o putere mare *in vitro*, față de compușii de referință. Aceasta demonstrează că acești compuși conform prezentei invenții prezintă citotoxicitate mare față de celulele canceroase și sunt utili în tratamentul cancerului.

5 Exemplul 5. Determinarea MTD și MTMD

Șoareci nu/nu Athymic Nude-Fox1 sau CD-1 (Envigo) femele s-au utilizat pentru toate experimentele. Animalele (N=10/cușcă) au fost ținute în cuști individuale ventilate (Sealsafe Plus®, Techniplast S.P.A.), pe un ciclu de 12 ore lumină-intuneric la 21-23°C și 40-60% umiditate. Șoarecii au avut acces liber la o dietă standard pentru rozătoare iradiate (Tecklad 2914C) și apă sterilizată. Animalele s-au aclimatizat pentru cinci zile înainte de a fi identificate cu tatuaj în mod individual. Protocoalele pentru animale au fost revizuite și aprobate conform cu Comitetele regionale de îngrijire a animalelor și utilizare a acestora.

Șoarecii au fost alocați aleatoriu în grupuri experimentale și li s-a administrat intravenos, MTD (Doză Maximum Tolerată) o singură dată de determinare sau o administrare pe săptămână timp de trei săptămâni consecutive, MTMD (Doză Multiplă Maximum Tolerată) pentru studiul de determinare. Animalelor li s-a administrat formulare albă sau cu compus dizolvat în formularea experimentală la concentrații diferite. Volumul administrat a fost totdeauna 10 mL/kg. După administrare, animalele au fost monitorizate pentru semne clinice ale toxicității sistemice, modificări în greutatea corpului și mortalitate până la 14 zile după administrare.

Rezultatele MTD sunt însumate în **Tabelul 3**

Tabel 3

Compus	Cale Schemă /	Doze (mg/Kg)	MTD (mg/kg)
Comp C	iv / SD	0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 4,00, 5,00	3,0
32		0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 5,00	0,5

Rezultatele MTMD sunt însumate în **Tabelul 4**

Tabel 4

Compus	Cale Schemă /	Doze (mg/Kg)	MTMD (mg/kg)
Comp C	iv / Q7dx3	0,0, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0	3,0
32		0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75	0,5
39-S		0,00, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00, 2,50, 5,00	1,25
ET-736		0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75	0,5
iv, intravenos			
Q7dx3, trei doze cumulate administrate săptămânal.			

Exemple 6-8. Xenogrefe *in vivo*

Șoareci nu/nu Athymic femele (Harlan Laboratories Models, S.L. Barcelona, Spain sau Envigo, Spain) s-au utilizat pentru toate experimentele. Animalele au fost ținute în cuști ventilate individual Sealsafe® Plus, Techniplast S.P.A.), până la zece pe cușcă pe un ciclu de 12 ore lumină-intuneric la 21-23°C și 40-60% umiditate. Șoarecii au avut acces liber la o dietă standard pentru rozătoare iradiate (Tecklad 2914C) și apă sterilizată. Animalele au fost aclimatizate pentru cel puțin 5 zile înainte de implantarea tumorii cu o suspensie de celule tumorale.

LINII CELULARE

Denumire	N° ATCC	N° ECCC*	Specii	Țesut	Caracteristici
HT1080	CCL-121	-	uman	conector	Fibrosarcom
MDA-MB-231	HTB-26	-	uman	san	Adenocarcinom de san

Denumire	N° ATCC	N° ECCC*	Specii	Țesut	Caracteristici
H460	HTB-177	-	uman	plămân, pleurezie	NSCLC
A2780	-	93112519	uman	ovarian	Carcinom ovarian
HGC27	-	94042256	uman	gastric	Carcinom gastric
H526	CRL-5811	-	uman	plămân	SCLC
H82	HTB-175	-	uman	plămân	SCLC
PC3	CLR-1435	-	uman	prostată; derivat din situs metastazic: oase	Adenocarcinom prostatic
DU145	HTB-81		uman	prostată; derivat din situs metastazic: creier	Carcinom prostatic
22Rv1	CRL-2505		uman	prostată	Carcinom prostatic
* European Collection of Cell Cultures					

Celulele HT1080 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în Minimum Essential Medium Eagle (MEME) (Sigma-Aldrich, Co). Fiecare animal a fost implantat ortotopic în mușchii gastrocnemius prin injecție intramusculară utilizând un ac 26G și o seringă de 1 cc cu 10x10⁶ HT1080 celule, la vârsta de 4-6 săptămâni, suspendate în mediu fără ser, fără antibiotice.

Celulele MDA-MB-231 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost trecute la fiecare 3 până la 5 zile după ce s-a ajuns la confluență. În fiecare animal a fost implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând ac 26G și o seringă de 1 cc) la vârsta de 4-6 săptămâni cu 7,5x10⁶ MDA-MB-231 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele H460 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost trecute la fiecare 3 până la 5 zile la atingerea confluenței. Fiecare animal a fost implantat subcutanat (în flancul drept utilizând un ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5x10⁶ H460 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele A2780 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost trecute la fiecare 3 până la 5 zile până la atingerea confluenței. Fiecare animal a fost implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând un ac de 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 10x10⁶ A2780 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele HGC27 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în mediu Iscove's Modified Dulbecco's (Sigma Aldrich, Co). Celulele de cultură au trecut de la 3 la 5 zile la confluență. În fiecare animal a fost implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5x10⁶ HGC-27 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences), 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele H526 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, Co). Celulele H526 au fost crescute ca suspensie și menținute prin adăugare de mediu proaspăt, astfel încât densitatea celulelor crește, la fiecare 2 până la 3 zile. În fiecare săptămână, cultura a fost restabilită prin centrifugarea suspensiei cu resuspensie ulterioară în mediu proaspăt la o concentrație de 1x10⁵ cell/mL. Fiecare animal a fost implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5x10⁶ H526 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele H82 s-au menținut *in vitro* la 37°C cu 5% CO₂ în RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, Co). Celulele H82 au crescut ca suspensie și s-au menținut prin adăugare de mediu proaspăt, astfel încât densitatea celulelor crește, la fiecare 2 până la 3 zile. În fiecare săptămână, cultura a fost restabilită prin centrifugarea suspensiei cu resuspensie ulterioară în mediu proaspăt la o concentrație de 1x10⁵ cell/mL. Animalele au fost implantate subcutanat (pe flancul drept utilizând ac 26G și o

seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5×10^6 H82 celule, suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele PC3 s-au menținut *in vitro* la 37°C cu 5 % CO₂ în mediu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost pasate la fiecare 3 până la 5 zile după ce au ajuns la confluență. La fiecare femelă de șoareci atimici s-a implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând un ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 3×10^6 PC3 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® Matrix (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice. În acest model, în locul masculilor, s-au utilizat animale femele deoarece creșterea PC-3 nu este dependentă de hormoni.

Celulele DU-145 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5 % CO₂ în mediu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost pasate la fiecare 3 până la 5 zile după ce au ajuns la confluență. La fiecare mascul de șoareci atimici s-a implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând un ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5×10^6 DU-145 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® Matrix (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Celulele 22Rv1 au fost menținute *in vitro* la 37°C cu 5 % CO₂ în mediu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Celulele de cultură au fost pasate la fiecare 3 până la 5 zile după ce au ajuns la confluență. La fiecare mascul de șoareci atimici s-a implantat subcutanat (pe flancul drept utilizând un ac 26G și o seringă de 1 cc) la 4-6 săptămâni de vârstă cu 5×10^6 22Rv1 celule suspendate în 0,05 mL de soluție constând din 50% Matrigel® Matrix (Corning Incorporated Life Sciences) și 50% mediu fără ser sau antibiotice.

Tolerabilitatea tratamentului s-a evaluat prin monitorizarea evoluției greutății, semne clinice ale toxicității, precum și dovezi ale afectării locale în locul injectării.

În studii de xenogrefare cu linia celulară HT1080:

- Măsurile diametrului total (tumoare + picior) s-au determinat utilizând etriere digitală (Fowler Silvac, S235PAT). Acest diametru total și greutatea corporale ale animalelor s-au măsurat de 2-3 ori pe săptămână începând cu prima zi a tratamentului (ziua 0).
- Când diametrul total a ajuns la o lungime de circa 7,0-8,0 mm, șoarecii au fost alocați aleator în grupuri de tratament și martor (N = 8-10/grup) pe baza greutății corporale și măsurărilor tumorilor utilizând NewLab Oncology Software (versiune 2.25.06.00).
- Comparatie a diametrului total median (tumoare + picior) în grupurile de tratament la diametrul total median (tumoare + picior) în grupul martor așa cum se utilizează pentru evaluarea eficacității antitumorale.
- Animalele au fost eutanasiate când diametrul total al piciorului acestora a ajuns la circa 18 mm.

În studii de xenogrefare cu alte linii celulare:

- Volumul tumorii a fost calculat utilizând ecuația $(a \cdot b^2)/2$, în care a: lungime (diametrul cel mai lung) și b: lățime (diametrul cel mai scurt) s-au măsurat în mm utilizând etriere digitală (Fowler Silvac, S235PAT). Dimensiunile tumorii și greutatea corporale au fost înregistrate de 2-3 ori pe săptămână începând cu prima zi de tratament.
- Când tumorile au ajuns la 150-250 mm³, animalele care aveau tumori (N = 8-10/grup) au fost alocate aleator în grupuri de tratament pe baza greutății corporale și măsurărilor tumorilor utilizând NewLab Oncology Software (version 2.25.06.00).
- Comparatie între volumul median al tumorii la grupurile tratate și grupul martor s-a utilizat pentru evaluarea eficacității antitumorale.
- Animalele au fost eutanasiate când tumorile acestora au ajuns la circa 2000 mm³ și/sau s-a observat necroză severă.

Tratamentele care produc >20 % letalitate și/sau 20% pierdere netă în greutate au fost considerate toxice.

Tabelele și figurile însumează datele obținute din grupurile experimentale complete, adică acele grupuri care păstrează numărul inițial de animale, n = 8-10. Totuși, odată ce primul animal este sacrificat datorită unei lungimi a tumorii > 18 mm sau o mărime a tumorii > 2000 mm³, grupul experimental va fi considerat incomplet. Prin urmare, datele generate ulterior zilei de sacrificiu și înainte nu vor fi prezentate (adică nici în tabele nici în figuri).

Exemplul 6. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** in cateva modele xenogrefe.

Compusul **39-S** și **C** au fost puse la dispoziție sub formă de flacoane uscate prin congelare cu produs liofilizat. Fiecare flacon a fost reconstituit cu apă sterilă pentru injecție până la o concentrație de 0,5 mg/mL. Au fost realizate diluții suplimentare cu soluție 5% dextroză pentru injectare la concentrația de formulare a dozei. Dozele administrate ale **39-S** și **C** au fost 1,25 și respectiv 3 mg/Kg.

Placebo a fost furnizat sub formă de flacoane de produs liofilizat. Fiecare flacon (zaharoză 200 mg + fosfat diacid de potasiu 13,6 mg + acid fosforic q.s. pH 3,8-4,5) a fost reconstituit cu apă sterilă pentru injecție (2 mL). Alte diluții au fost făcute cu soluție de dextroză 5% pentru injectare.

În aceste experimente, **39-S** și compusul **C**, precum și placebo, au fost administrate intravenos cu o schemă săptămânală la un volum de 10 mL/Kg.

Exemplul 6a. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** in xenogrefe de fibrosarcom uman.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua activitatea antitumorală a compusului **39-S** prin comparație cu activitatea antitumorală a compusului **C** prin utilizarea unui model de xenogrefă de sarcom uman.

Modelul de tumoare utilizat în acest studiu a fost linia celulară HT1080.

Tabelul 5 raportează evaluarea diametrului total (tumoare + picior) de la tumorile HT1080 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt de asemenea prezentate în **Figura 1**.

Tabel 5

Zile	Diametru total (tumoare + picior) (mm)		
	Martor	39-S	Compus C
0	7,5	7,5	7,5
2	9,4	7,9	8,8
5	11,4	6,4	9,0
7	12,1	6,8	9,6
9	13,2	6,9	10,2
12	14,5	6,6	10,2
14	15,2	6,4	11,2
16	15,9	6,8	12,4
19	18,0	7,0	13,3
21		7,0	15,2
23		8,5	18,0
27		10,8	
30		12,5	
33		14,3	
35		15,3	
37		18,0	

Exemplul 6b. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** in xenogrefe de adenocarcinom de san uman.

Scopul studiului a fost de a compara activitățile antitumorale ale **39-S** și compusului **C** utilizând un model de xenogrefă de cancer de sân uman.

Modelul de tumoare utilizat în acest studiu a fost linia celulară MDA-MB-231.

Tabelul 6 raportează evaluarea volumului median al tumorilor de MDA-MB-231 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt de asemenea prezentate în **Figura 2**.

Tabel 6.

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)
------	--

	Martor	39-S	Compus C
0	149,4	151,0	149,4
2	240,0	209,3	217,1
5	325,1	290,9	281,3
7	407,8	301,8	338,6
9	514,8	300,8	385,1
12	648,1	278,7	400,4
14	799,0	249,7	436,9
16	1002,5	243,6	585,7
19	1233,9	248,3	774,7
21	1539,1	250,0	965,9
23	2006,5	260,3	1215,2
26	2027,7	304,9	1503,2
28		337,1	1785,3
30		451,3	2037,1
33		584,1	
35		683,4	
37		784,7	
40		937,4	
42		1060,5	
44		1170,5	
47		1112,9	
49		1138,6	
51		1283,2	
54		1415,1	
56		1518,7	
58		1728,5	
61		2017,9	

Exemplul 6c. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** în xenogrefe de cancer pulmonar uman.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitatea antitumorală a **39-S** cu activitatea antitumorală a compusului **C** prin utilizarea a trei modele de xenogrefe diferite de cancer pulmonar uman. Aceste modele corespund la cancer pulmonar fără celule mici (linie celulară H-460) și la cancer pulmonar cu celule mici (linii celulare H526 și H82).

Tabelul 7 raportează evaluarea volumului mediu al tumorilor H460 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în Figura 3.

Tabel 7

Zile	Volum median al tumorii (mm³)		
	Martor	39-S	Compus C
0	187,4	187,8	186,1
2	577,5	314,4	395,4
5	1352,0	584,1	665,9
7	1642,9	831,2	929,5
9	2025,0	841,0	1063,7

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	39-S	Compus C
12		1008,0	1436,5
14		1309,8	2025,0
16		1470,0	2025,0
19		2025,0	

Tabelul 8 raportează evaluarea volumului median al tumorilor H526 la șoareci tratați cu placebo, compus C și 39-S. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 4**.

Tabel 8

5

zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Control	39-S	compus C
0	217,2	214,5	217,9
2	410,7	260,3	262,4
4	778,5	80,0	108,3
7	1083,2	46,2	129,8
9	1371,0	32,0	85,9
11	1782,0	32,0	52,3
14	2025,0	4,0	54,1
16		4,0	47,3
21		4,0	4,0
28		4,0	4,0
35		4,0	4,0
42		4,0	62,5
49		4,0	53,5
56		4,0	70,0
63		4,0	132,3
70		4,0	368,5
77		4,0	465,8
84		4,0	107,4
91		4,0	130,0
98		4,0	4,0
105		4,0	4,0
112		4,0	4,0
119		4,0	4,0
126		4,0	4,0
133		4,0	4,0
140		4,0	4,0
147		4,0	4,0
165		4,0	4,0
175		4,0	4,0
191		4,0	4,0
205		4,0	4,0

Tabelul 9 raportează evaluarea volumului median al tumorilor H82 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 5**.

Tabel 9.

5

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	39-S	Compus C
0	171,6	170,3	170,5
2	439,4	325,2	265,3
5	1024,7	430,8	488,7
7	1422,0	466,2	760,0
9	1923,8	544,3	899,5
12	2025,0	640,3	1038,5
14		711,2	1213,4
16		802,7	1256,4
19		916,0	1741,5
21		1047,2	1878,8
23		1189,1	2057,0
26		1497,2	
28		1741,8	
30		1731,7	
33		2029,4	

Exemplul 6d. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** în xenogrefe de tumoare ovariană umană.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitatea antitumorală a **39-S** cu activitatea antitumorală a compusului **C** utilizând un model xenogrefă de cancer ovarian uman.

Modelul de tumoare în acest studiu a fost A2780.

Tabelul 10 raportează evaluarea volumului tumorilor A2780 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 6**.

10

15 **Tabel 10**

Ziua	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	39-S	Compus C
0	169,5	170,5	169,6
2	317,5	206,5	206,3
5	758,9	163,4	372,7
7	1351,9	298,6	607,6
9	1675,8	317,4	696,2
12	2025,0	378,2	855,6
14		668,5	1293,9
16		853,5	1683,5
19		1415,5	2137,5
21		1519,2	
23		1666,0	
30		2025,0	

Exemplul 6e. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **39-S** in xenogrefe de tumoare gastrică umană.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitatea antitumorală a **39-S** cu activitatea antitumorală a compusului **C** utilizând un model de xenogrefă de cancer gastric uman.

Modelul de tumoare utilizat in acest studiu a fost HGC27.

Tabelul 11 raportează creșterea volumului tumorilor HGC27 la șoareci tratați cu placebo, compus **C** și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 7**.

Tabel 11

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	39-S	Compus C
0	200,7	195,6	195,0
2	429,0	356,3	391,0
5	835,5	469,7	578,6
7	1256,5	467,8	708,2
9	1602,2	575,2	937,7
12	2040,7	611,1	1169,5
14		637,3	1496,8
16		690,4	1690,6
19		701,8	2004,0
21		697,4	1741,4
23		715,5	2056,4
26		898,1	
28		1163,4	
30		1409,3	
33		1450,5	
35		1708,5	
37		1804,4	
40		2075,2	

Exemplul 7. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **32** in diverse modele de xenogrefe. Compușii **32** și **ET-736** au fost furnizați sub formă de flacoane uscate la congelare de produs liofilizat. Fiecare flacon a fost reconstituit cu apă sterilă pentru injectare până la o concentrație de 0,5 mg/mL. S-au făcut alte diluții cu soluție 5% dextroză pentru injectare la concentrația formulării de dozare. Doza administrată de **32** și **ET-736** a fost 0,5 mg/Kg.

A fost furnizat placebo sub formă de produs liofilizat. Fiecare flacon (zaharoză 200 mg + fosfat diacid de potasiu 13,6 mg + acid fosforic q.s. pH 3,8-4,5) a fost reconstituit cu apă sterilă pentru injecție (2 mL). S-au făcut diluții în continuare cu soluție 5% dextroză pentru injectare.

In aceste experimente, **32** și **ET-736**, precum și placebo, s-au administrat intravenos pe o schemă săptămânală la un volum de 10 mL/Kg.

Exemplul 7a. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **32** in xenografe de fibrosarcom uman.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua activitatea antitumorală a compusului **32** in comparație cu activitatea antitumorală a **ET-736** utilizând un model xenogrefă de sarcom uman.

Modelul de tumoare utilizat in acest studiu a fost linia celulară HT-1080.

Tabelul 12 raportează evaluarea diametrului total (tumoare + picior) a tumorilor HT1080 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 8**.

Tabel 12

Zile	Diametru total (tumoare + picior) (mm)		
	Martor	32	ET-736
0	7,5	7,5	7,4
2	9,4	8,9	8,3
5	11,4	8,2	7,1
7	12,1	8,8	7,6
9	13,2	10,0	7,4
12	14,5	8,8	7,0
14	15,2	10,8	7,1
16	15,9	11,8	7,4
19	18,0	12,0	8,4
21		14,0	8,6
23		13,8	10,0
27		13,6	10,9
30		15,5	13,2
33		18,0	14,3
35			15,2
37			15,8
40			16,6
42			18,0

Exemplul 7b. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **32** în xenogrefe de adenocarcinom de sân uman.

5 Scopul acestui studiu a fost de a compara activitățile antitumorale ale **32** și **ET-736** utilizând un model de xenogrefă de cancer de sân uman.

Modelul de tumoare utilizat în acest studiu a fost linia celulară MDA-MB-231.

Tabelul 13 raportează evaluarea volumului median al tumorilor de MDA-MB-231 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 9**.

10

Tabel 13

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	149,4	150,2	150,0
2	240,0	233,6	237,7
5	325,1	310,6	302,1
7	407,8	386,1	364,9
9	514,8	437,5	404,6
12	648,1	493,4	395,4
14	799,0	560,3	398,3
16	1002,5	649,5	447,2
19	1233,9	853,0	485,0
21	1539,1	1017,5	536,3
23	2006,5	1263,2	669,8
26	2027,7	1487,7	778,9

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
28		1726,6	1046,1
30		1892,6	1315,9
33		2082,8	1664,9
35			2007,7

Exemplul 7c. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **32** in xenogrefe de cancer pulmonar uman.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitățile antitumorale ale **32** și **ET-736** prin utilizarea a trei modele diferite de xenogrefe de cancer pulmonar uman. Aceste modele corespund la cancer pulmonar fără celule mici (linie celulară H-460) și la cancer pulmonar cu celule mici (linii celulare H526 și H82).

Tabel 14 raportează evaluarea volumului median al tumorii la tumori H460 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 10**.

Tabel 14

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	187,4	183,9	185,8
2	577,5	455,2	457,8
5	1352,0	784,8	732,8
7	1642,9	837,4	930,1
9	2025,0	1044,3	1207,2
12	2025,0	1452,4	1568,0
14		1845,5	1845,5
16		2025,0	2025,0

Tabelul 15 raportează evaluarea volumului tumorii la tumori H526 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 11**.

Tabel 15

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	217,2	212,1	213,5
2	410,7	277,3	240,5
4	778,5	127,0	97,2
7	1083,2	95,0	48,8
9	1371,0	63,1	62,5
11	1782,0	62,5	62,5
14	2025,0	62,5	47,3
16		62,5	32,0

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
21		4,0	4,0
28		4,0	4,0
35		55,3	4,0
42		85,3	4,0
49		185,6	4,0
56		169,1	4,0
63		62,5	4,0
70		88,9	4,0
77		280,6	4,0
84		694,2	199,8
91		1150,9	786,5

Tabelul 16 raportează evaluarea volumului median al tumorii la tumori H82 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 12**.

Tabel 16

5

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	171,6	171,6	170,0
2	439,4	309,4	334,4
5	1024,7	485,0	539,4
7	1422,0	708,4	836,4
9	1923,8	972,6	1013,1
12	2025,0	1101,6	1290,9
14		1339,6	1648,0
16		1430,3	
19		1885,7	

Exemplul 7d. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui **32** la xenogrefe de tumoare ovariană umană.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitățile antitumorale ale **32** și **ET-736** prin utilizarea de model xenogrefă de cancer ovarian uman.

Modelul de tumoare utilizat în acest studiu a fost A2780.

Tabelul 17 raportează evaluarea volumului tumorilor A2780 la șoareci tratați cu placebo, **ET-736** și **32**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 13**.

Tabel 17

15

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	169,5	168,6	168,8
2	317,5	262,9	251,2
5	758,9	572,7	382,6
7	1351,9	997,5	676,1
9	1675,8	1359,9	959,4

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
12	2025,0	1715,0	1241,5
14		2025,0	1582,7
16		2025,0	1646,4
19			1845,5
21			2025,0

Exemplul 7e. Studii *in vivo* pentru a determina efectul lui 32 in xenogrefe de tumoare gastrică umană.

Scopul acestui studiu a fost de a compara activitățile antitumorale ale 32 și ET-736 prin utilizarea de model de xenogrefă de cancer gastric uman.

Modelul de tumoare utilizat in acest studiu a fost HGC27.

Tabelul 18 raportează creșterea în volum a tumorilor HGC27 la șoareci tratați cu placebo, ET-736 și 32. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 14**.

Tabel 18

Zile	Volum median al tumorii (mm ³)		
	Martor	32	ET-736
0	200,7	194,8	195,9
2	429,0	386,3	359,2
5	835,5	551,3	537,6
7	1256,5	579,2	553,5
9	1602,2	665,8	604,7
12	2040,7	701,1	627,4
14		814,5	648,0
16		959,9	687,6
19		1312,4	760,0
21		1626,8	792,4
23		1737,3	818,9
26			1026,1
28			1354,9

Exemplul 8 (pentru referință).Studiile *in vivo* pentru a determina efectul lui 39-S in xenogrefe de prostată umană. Scopul acestui studiu a fost de a compara activitatea antitumorală a 39-S prin utilizarea a trei modele de xenogrefă diferite de cancer de prostată uman. Aceste modele corespund liniilor celulare PC-3, DU-145 și 22Rv1.

Compusul 39-S a fost furnizat în formă de flacoane uscate prin congelare de produs liofilizat. Fiecare flacon a fost reconstituit cu apă sterilă pentru injectare la o concentrație de 0,5 mg/mL. Alte diluții au fost făcute cu soluție 5% dextroză pentru injectare la concentrația de formulare de dozare. Doza administrată de 39-S a variat în funcție de studiu, fiind 1,25 mg/Kg când modelul de tumoare a fost PC-3, 1,00 mg/Kg cand modelul de tumoare a fost DU-145 și respectiv 0,75 mg/Kg cand modelul de tumoare a fost 22Rv1.

Placebo a fost furnizat sub formă de turtă liofilizată conținând 100 mg zaharoză + fosfat diacid de potasiu 6,8 mg + acid fosforic q.s. pH 3,8-4,5 care s-a reconstituit cu apă pentru perfuzie.

In aceste experimente, 39-S, precum și placebo, au fost administrate intravenos o dată pe săptămână pentru 3 săptămâni consecutive, în zilele 0, 7 și 14, ori de cate ori a fost posibil.

Tabelul 19 raportează evaluarea volumului median al tumorii la tumorile PC-3 la șoareci tratați cu placebo și 39-S. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în **Figura 15**.

Tabel 19

Volum median al tumorii (mm ³)		
Zile	Martor	39-S
0	181,9	182,3
2	254,8	222,6
4	308,7	244,0
7	344,5	269,3
9	396,8	295,8
11	439,2	315,0
14	542,7	356,9
16	619,0	388,0
18	721,3	400,1
21	908,1	503,3
23	1039,1	556,0
25	1117,0	579,6
28	1232,3	694,9
30	1778,6	811,1
32	2018,1	1027,1
35		1194,3
37		1495,0
39		1710,7
42		2066,2

5 **Tabelul 20** raportează evaluarea volumului median al tumorii la tumorile DU-145 la șoareci tratați cu placebo și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în Figura 16.

Tabel 20

Volum median al tumorii (mm ³)		
zile	Control	39-S
0	156,8	179,9
2	198,3	199,9
4	253,9	222,2
7	325,8	340,5
9	385,1	354,1
11	462,2	349,7
14	483,8	429,1
16	599,0	454,8
18	664,0	449,7
21	816,9	517,5
23	861,3	568,5
25	977,9	629,4
28	973,6	775,7

Tabelul 21 raportează evaluarea volumului median al tumorii la tumorile 22Rv1 la șoareci tratați cu placebo și **39-S**. Aceste rezultate sunt arătate de asemenea în Figura 17.

Tabel 21

5

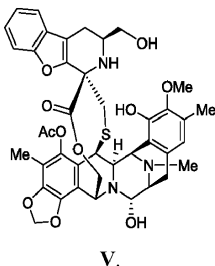
Volum median al tumorii (mm³)		
Zile	Martor	39-S
0	174,6	173,5
3	307,2	93,0
5	511,5	96,8
7	739,1	115,2
10	955,2	108,2
12	1286,1	128,4
14	1385,8	155,6
17	1791,1	173,4
19	2025,0	210,2
24		358,8
26		456,5
28		645,2
31		1049,5
33		1439,4
35		2025,0

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

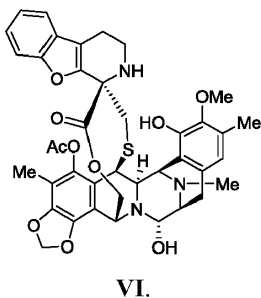
- WO-A1-03/014127
- WO-A1-2011/147828

(57) Revendicări:

1. Compus cu formula **V** sau sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic:



2. Compus cu formula **VI** sau sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic:



3. Compus conform revendicării 1 sau revendicării 2, în care sarea este aleasă dintre clorhidrat, bromhidrat, iodhidrat, sulfat, azotat, fosfat, acetat, trifluoroacetat, maleat, fumarat, citrat, oxalat, succinat, tartrat, malat, mandelat, metansulfonat, *p*-toluensulfonat; săruri de sodiu, potasiu, calciu, amoniu; și săruri de etilendiamină, etanolamină, *N,N*-dialchilentanolină, trietanolină și de aminoacizi bazici.

4. Compoziție farmaceutică care cuprinde un compus conform cu oricare dintre revendicările 1 până la 3 sau sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

5. Formă de dozare care cuprinde o compoziție farmaceutică conform revendicării 4.

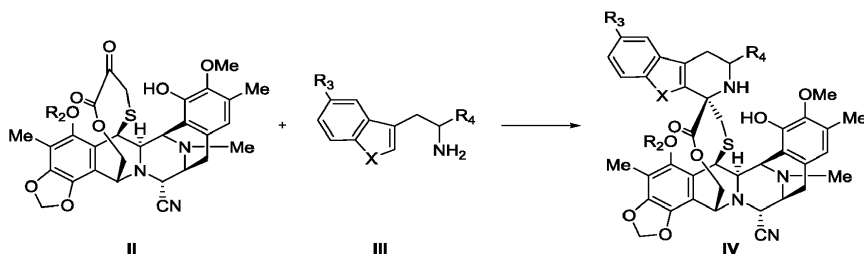
6. Compus conform cu oricare dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic, o compoziție conform revendicării 4 sau o formă de dozare conform revendicării 5, pentru utilizare ca medicament.

7. Compus conform cu oricare dintre revendicările 1 până la 3 sau sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic, o compoziție conform revendicării 4 sau o formă de dozare conform revendicării 5, pentru utilizare în tratamentul cancerului.

8. Compus, compoziție sau formă de dozare conform revendicării 7, în care cancerul este ales dintre cancerul pulmonar inclusiv cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de colon, cancerul colorectal, cancerul de san, cancerul de pancreas, sarcom, cancer ovarian și cancer gastric.

9. Compus, compoziție sau formă de dozare conform revendicării 8, în care cancerul este ales dintre cancerul pulmonar inclusiv cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul de san, cancerul de pancreas și canceru colorectal 1.

10. Procedeu pentru obținerea unui compus cu formula **V** așa cum s-a definit în revendicarea 1 sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic: care cuprinde etapa de reacție a compusului cu formula **II** cu un compus cu formula **III** la un compus cu formula **IV**:



in care:

X este -O-;

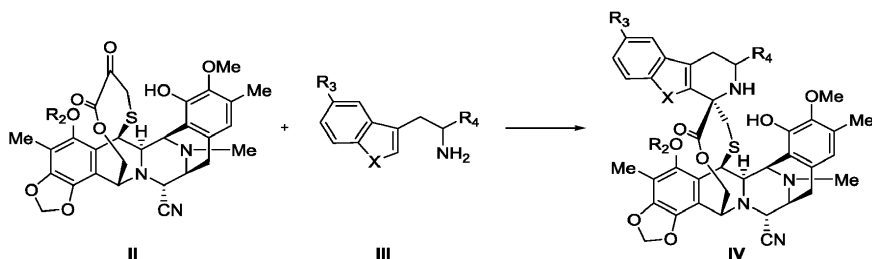
R₂ este acetil;

R₃ este hidrogen;

R₄ este -CH₂OH.

11. Procedeu conform revendicării 10, care cuprinde etapa următoare de înlocuire a grupării ciano în compusul cu formula IV cu o grupare hidroxi pentru a se obține un compus cu formula V.

12. Procedeu pentru obținerea unui compus cu formula VI așa cum s-a definit în revendicarea 2 sau o sare sau ester al acestuia acceptabil din punct de vedere farmaceutic: care cuprinde etapa de reacție a compusului cu formula II cu un compus cu formula III pentru a se obține un compus cu formula IV:



in care:

X este -O-;

R₂ este acetil;

R₃ este hidrogen;

R₄ este hidrogen.

13. Procedeu conform revendicării 12, care cuprinde etapa suplimentară de înlocuire a grupării ciano în compusul cu formula IV cu o grupare hidroxi pentru a se obține un compus cu formula VI.

14. Kit care cuprinde o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic de compus conform cu oricare dintre revendicările 1 la 3 și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

15. Kit conform revendicării 14 care cuprinde în plus instrucțiuni pentru utilizarea compusului în tratamentul cancerului și mai preferabil cancer ales dintre cancer pulmonar, inclusiv cancer pulmonar fără celule mici și cancer pulmonar cu celule mici, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de san, cancer de pancreas, sarcom, cancer ovarian și cancer gastric.

35

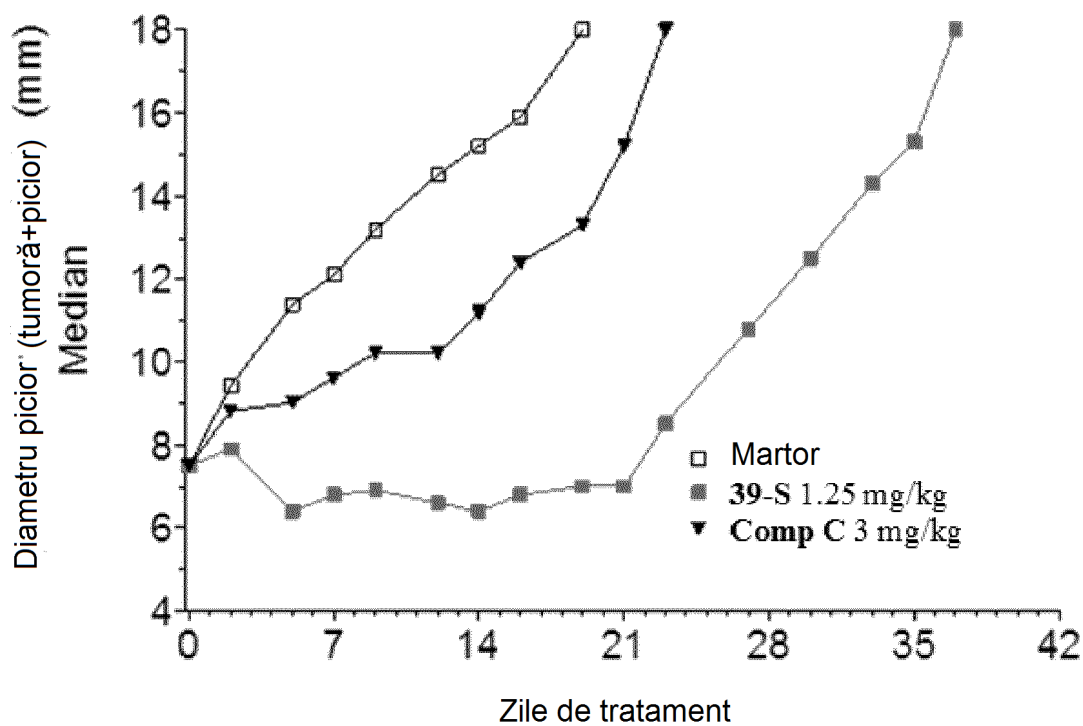


Figura 1

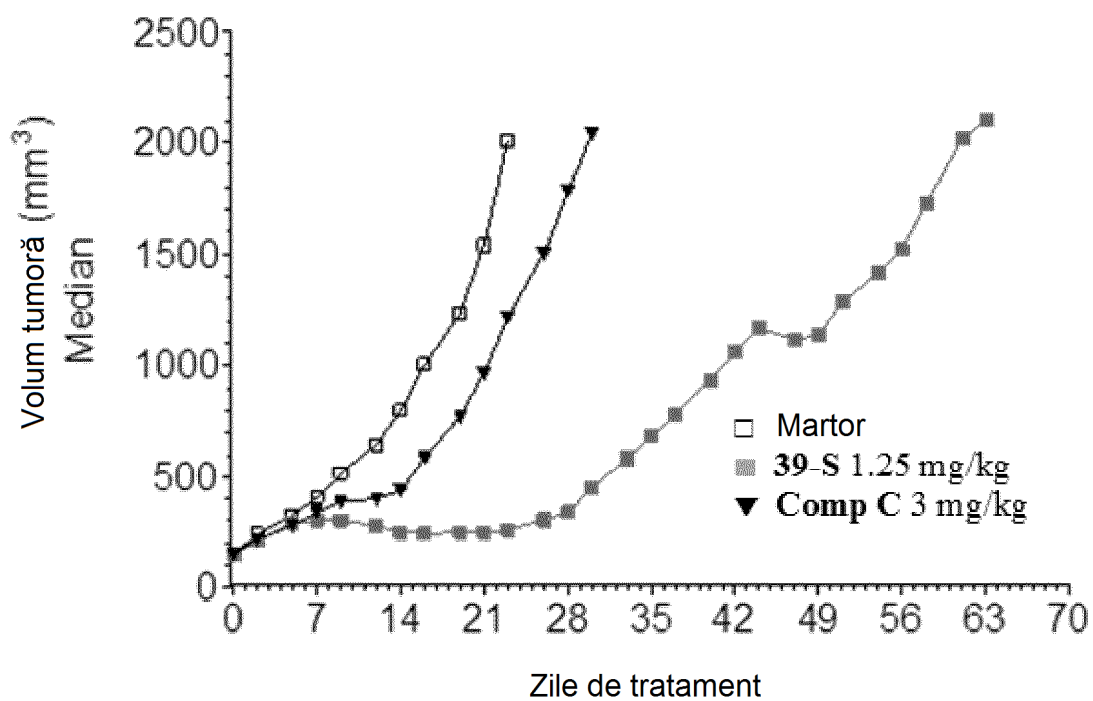


Figura 2

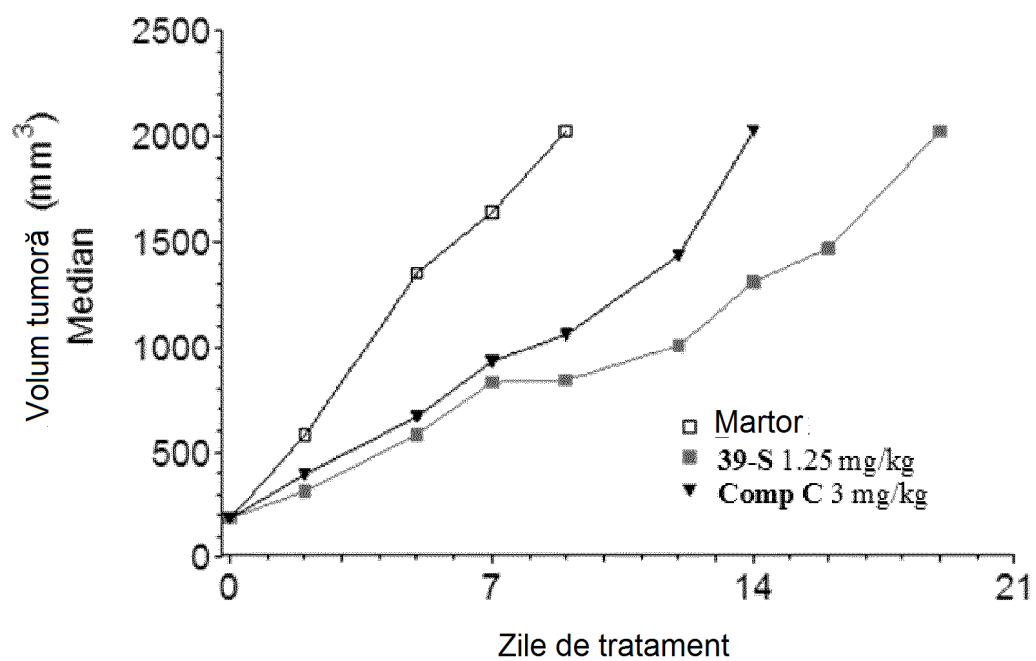


Figura 3

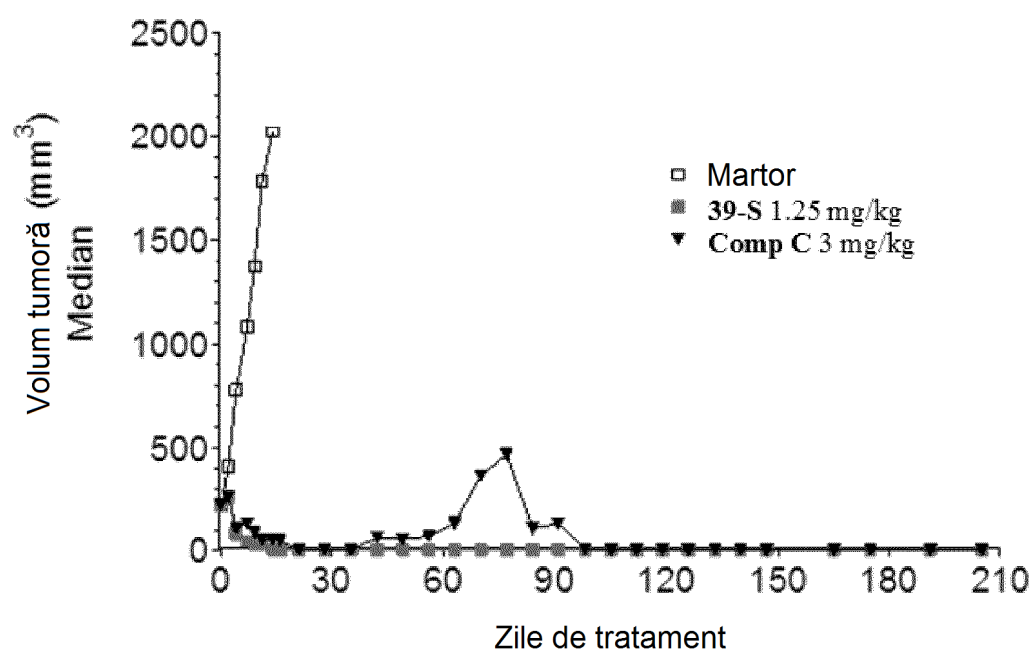


Figura 4

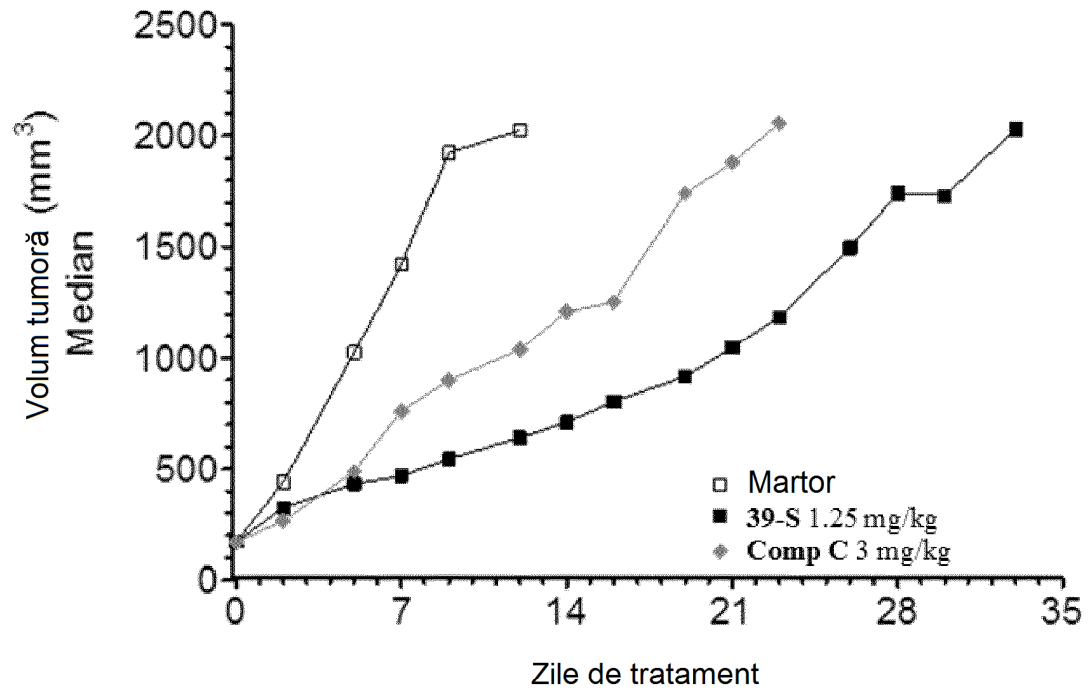


Figura 5

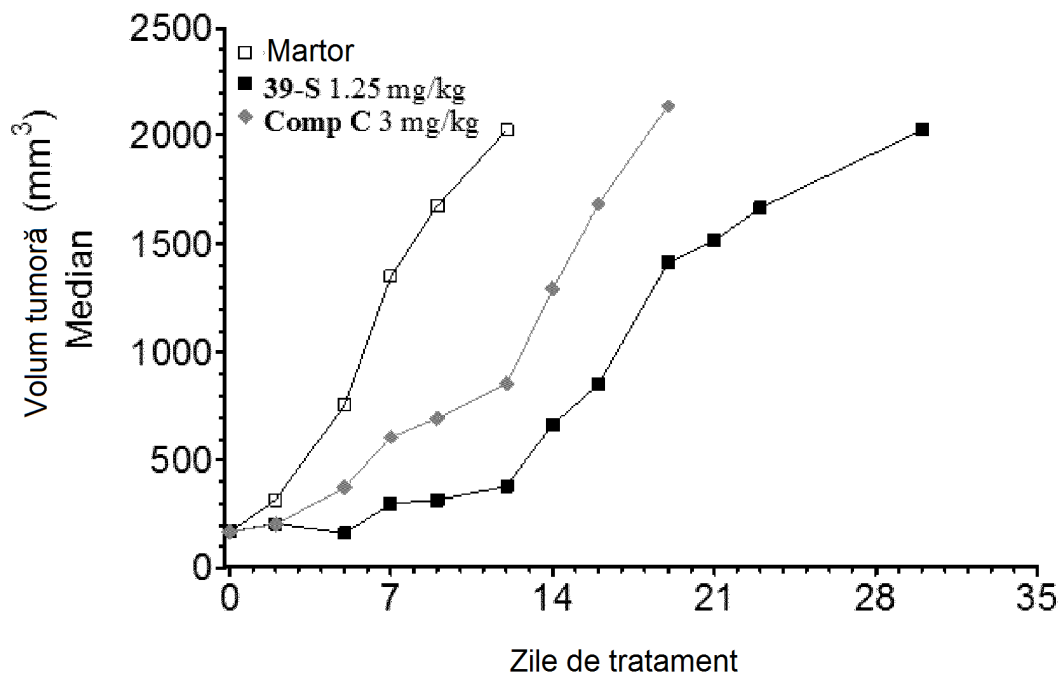


Figura 6

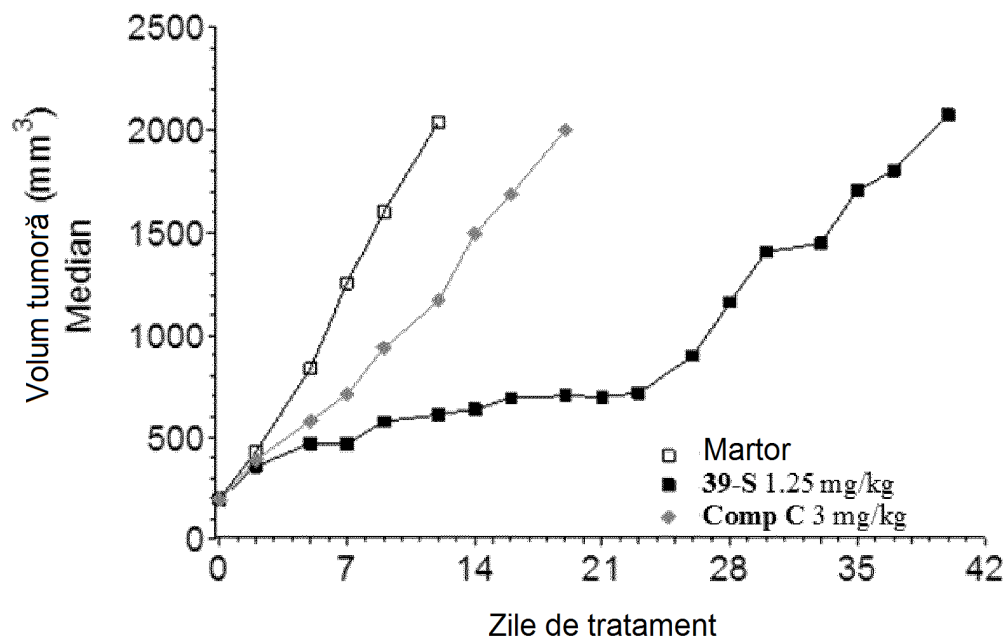


Figura 7

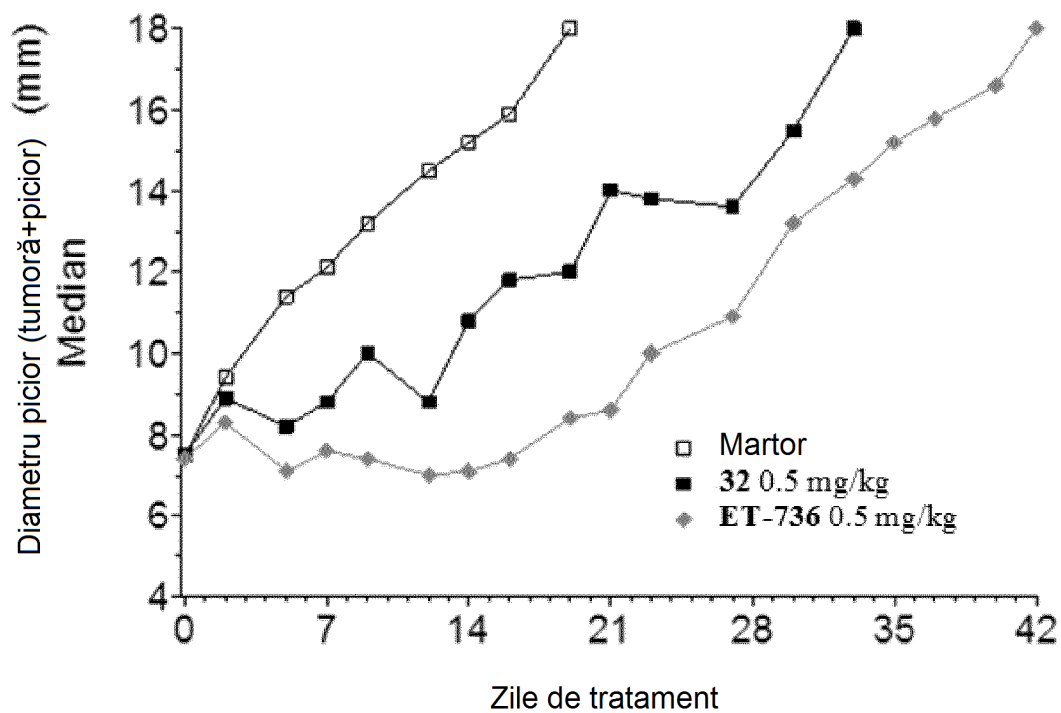


Figura 8

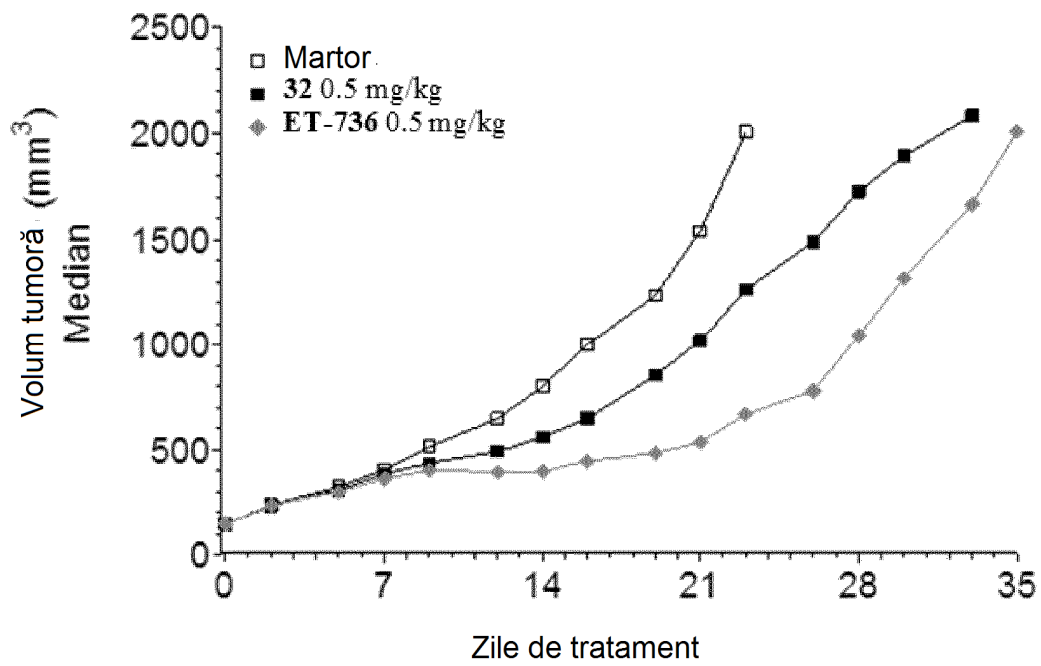


Figura 9

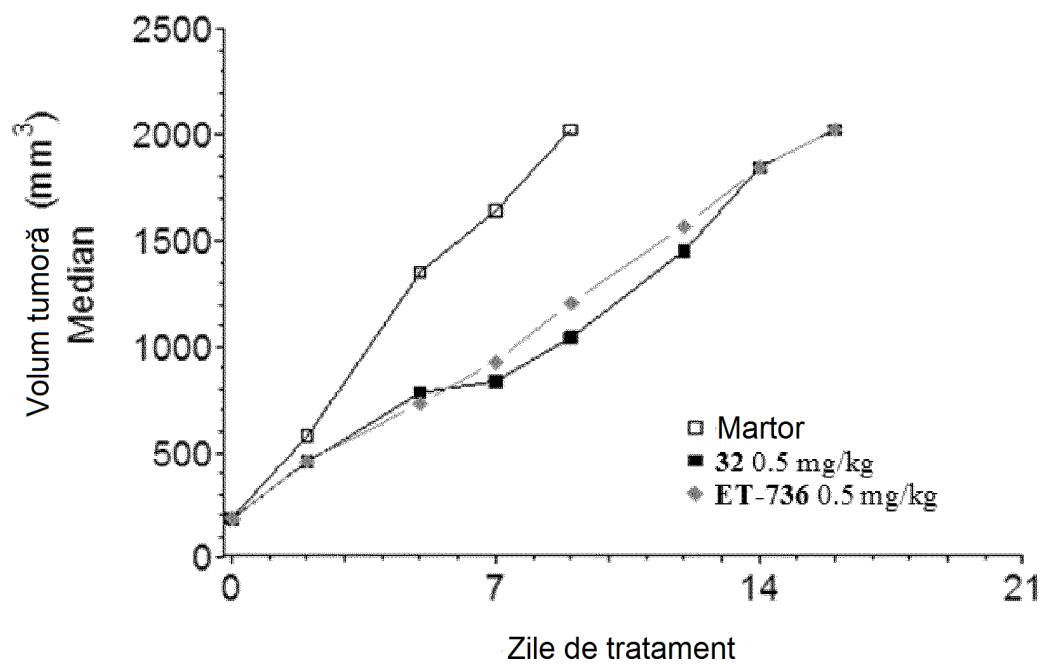


Figura 10

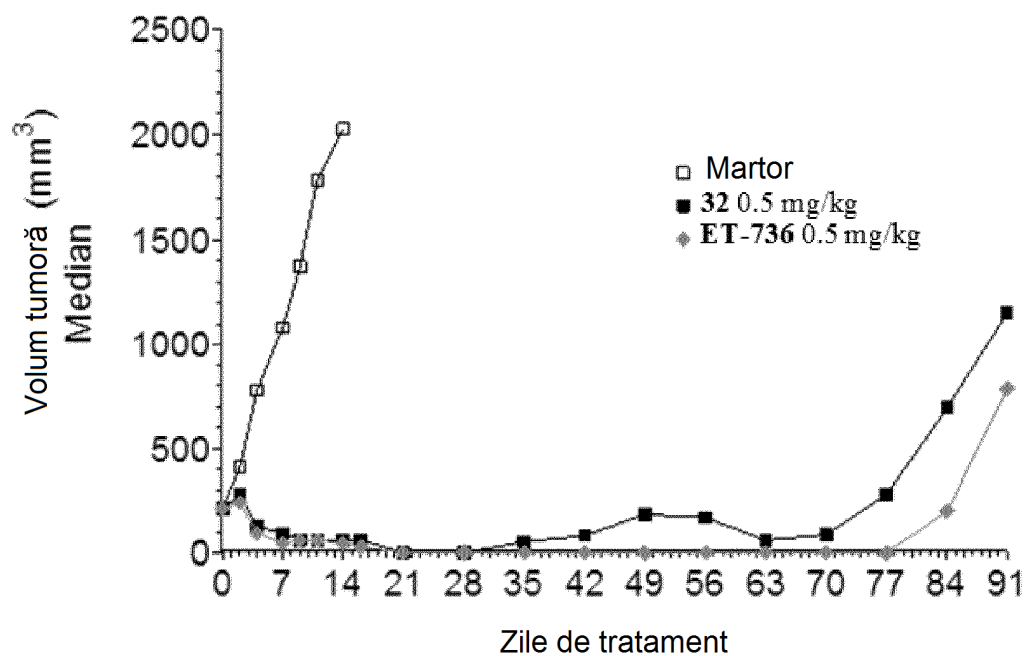


Figura 11

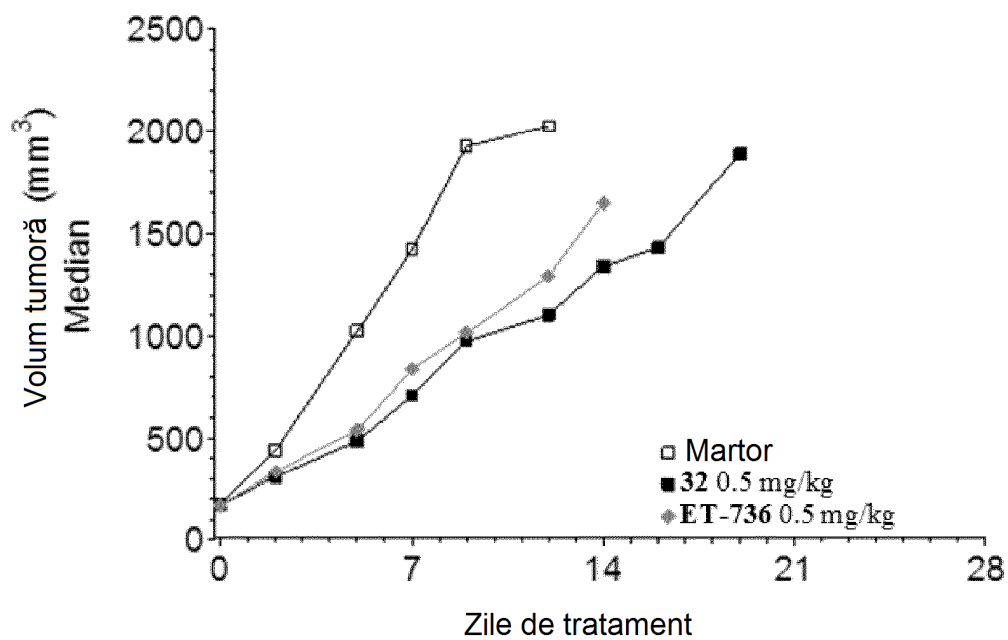


Figura 12

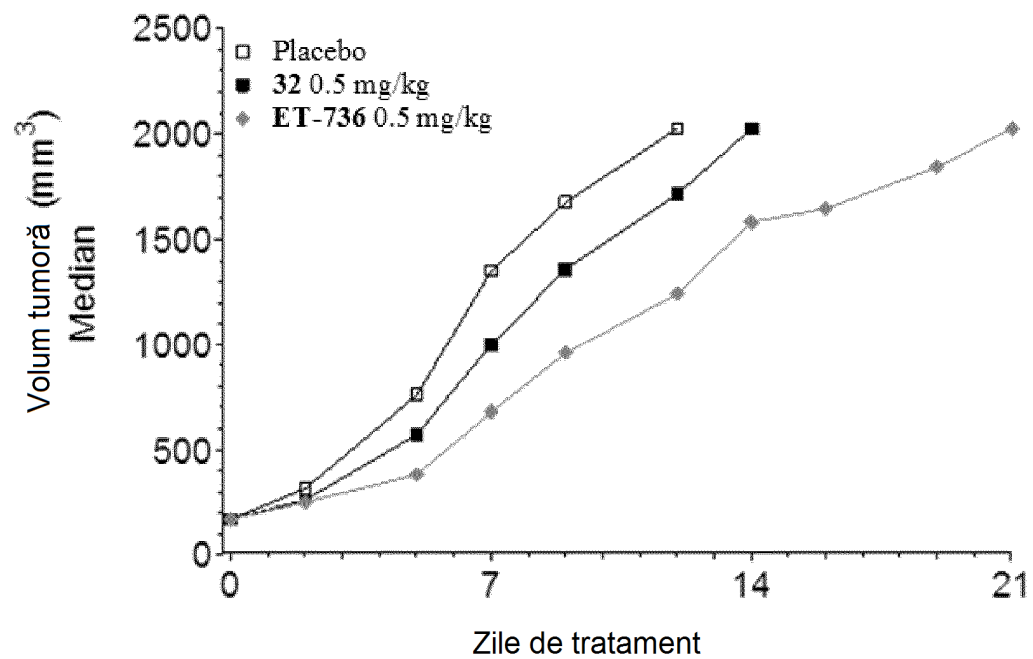


Figura 13

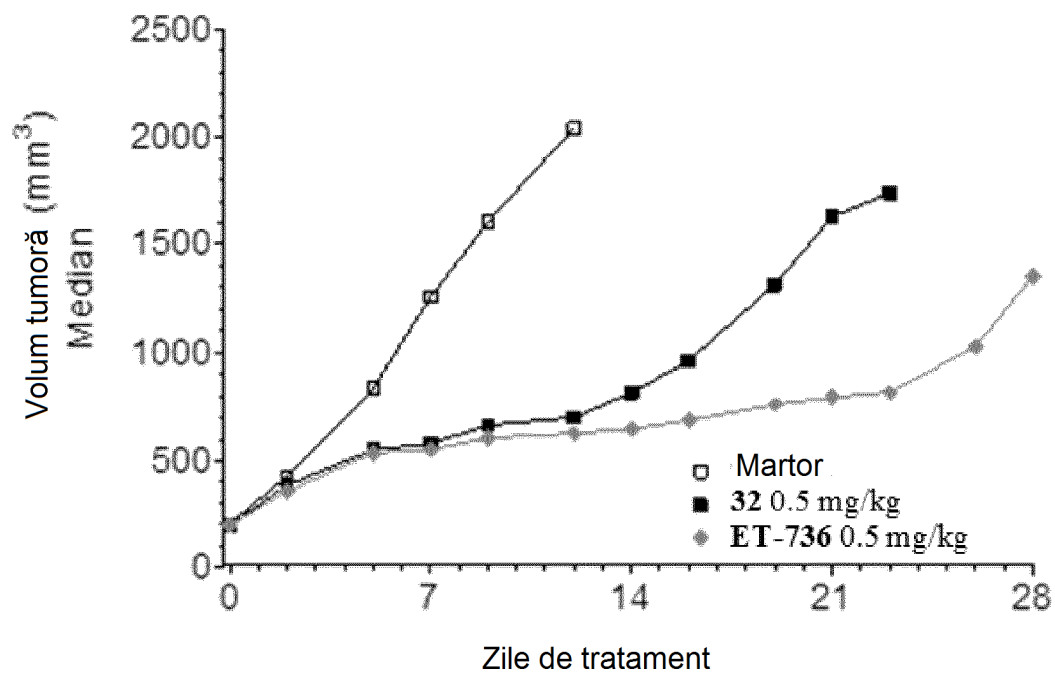


Figura 14

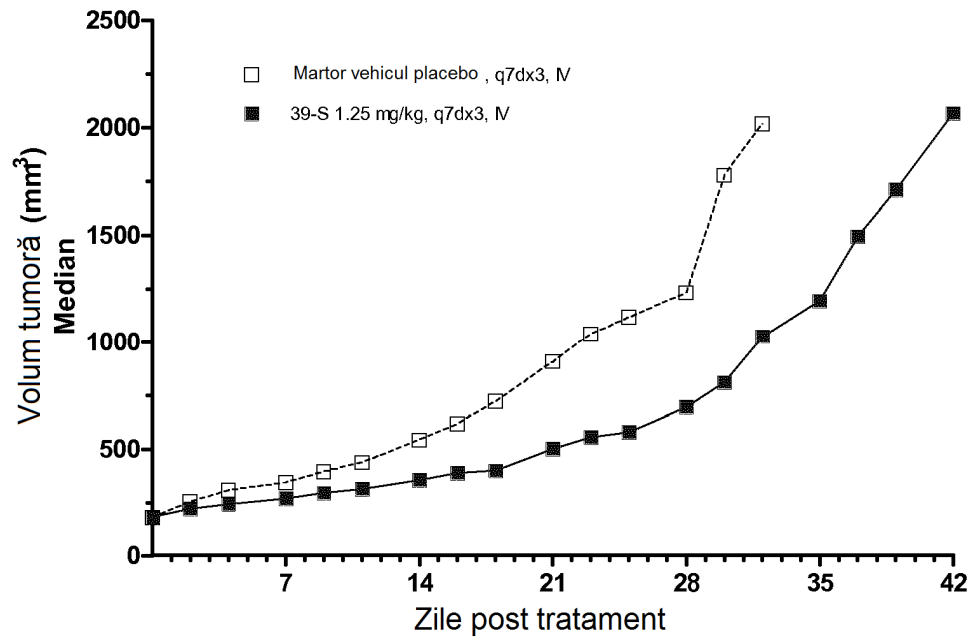


Figura 15

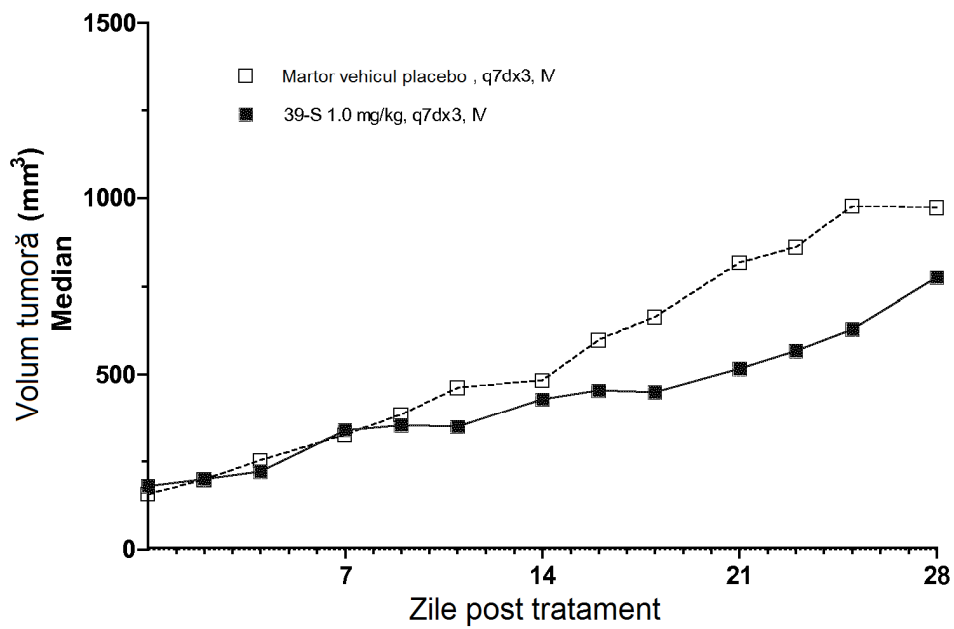


Figura 16

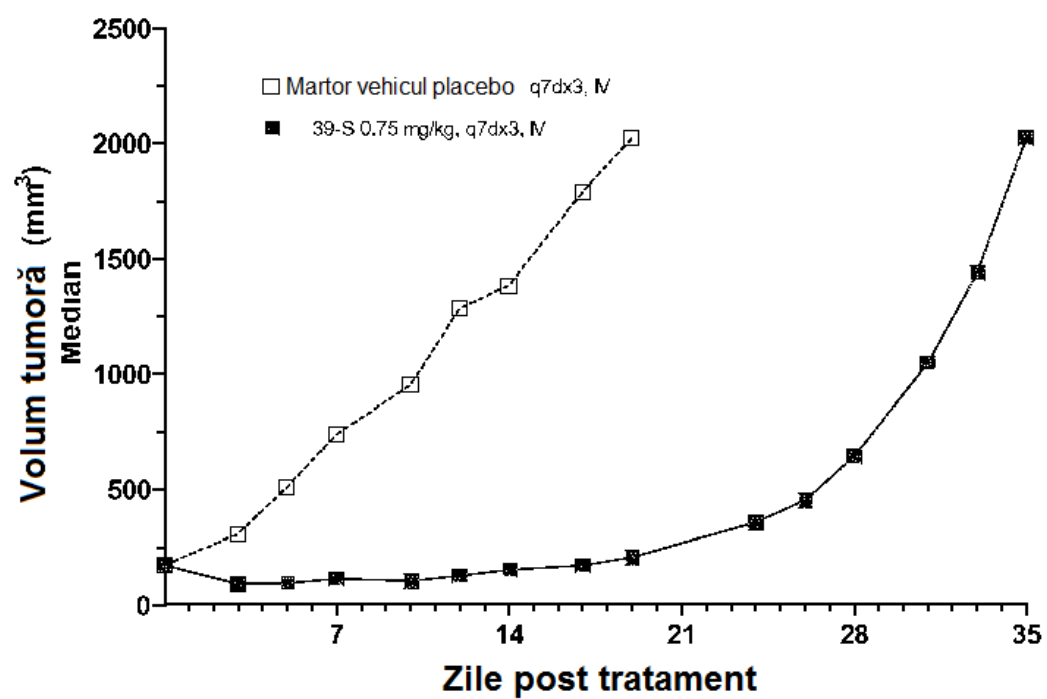


Figura 17