

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201692376** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.08.31

(22) Дата подачи заявки
2015.05.21

(51) Int. Cl. **C08G 83/00** (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ С СУЛЬФАТИРОВАННЫМИ ДЕНДРИМЕРАМИ
ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО НАЦЕЛИВАНИЯ**

(31) **14169362.2**

(32) **2014.05.21**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2015/061258**

(87) **WO 2015/177279 2015.11.26**

(71) Заявитель:
АйСи ДИСКАВЕРИ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Лиха Кай, Ширнер Михаэль (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым дендримерным конъюгатам, способам их получения и их использованию для лечения заболеваний. Изобретение описывает новый способ доставки конъюгатов дендримеров с терапевтически активными молекулами в клетку путем использования белков для трансмембранного переноса растворенных веществ, обеспечивая захват дендримерных конъюгатов по изобретению. Конкретный объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу, в которой $D(OSO_3^-M^+)_n$ представляет собой дендример D, несущий количество n сульфатных групп $OSO_3^-M^+$, где количество n сульфатных групп выбрано из диапазона от 6 до 96, где M представляет собой катионный неорганический или органический противоион к анионной сульфатной группе, где L представляет собой линкер или спейсер между D и E, где G представляет собой соединительную функциональную группу, образующую соединение между L и E, и где m равно целому числу от 1 до 20.

A1

201692376

201692376

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ С СУЛЬФАТИРОВАННЫМИ ДЕНДРИМЕРАМИ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО НАЦЕЛИВАНИЯ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым дендримерным конъюгатам, способам их получения и их использованию для лечения заболеваний. Изобретение описывает новый способ доставки конъюгатов дендримеров с терапевтически активными молекулами в клетку путем использования транспортных белков, обеспечивающих захват дендримерных конъюгатов по изобретению и взаимодействие указанных терапевтически активных молекул с молекулами, связанными с заболеванием, непосредственно внутри клетки.

Уровень техники

В последние десятилетия был достигнут значительный прогресс в повышении эффективности диагностических и терапевтических препаратов. Для устранения серьезных нежелательных эффектов препарата в отношении здоровых тканей и органов в течение последних десятилетий придерживались нескольких стратегий. Исследования препаратов были сосредоточены преимущественно на новых мишенях, которые предположительно обеспечивали заболевание-специфическую экспрессию целевого механизма. В отношении открытия механизмов передачи сигнала в пролиферирующих и активированных клетках были определены многочисленные новые цели. Тем не менее, за редким исключением, терапевтическая атака большинства недавно обнаруженных лекарственных мишеней оставалась менее эффективной, поскольку терапевтическая молекула должна обладать физико-химическими свойствами для проникновения в ткани, мембранные барьеры и клетки для достижения цели, в частности, когда мишень экспрессируется внутри клеток. Таким образом, для повышения биодоступности клинически одобренных терапевтических препаратов было приложено много усилий. Для повышения биодоступности препаратов клинические исследования были сосредоточены на химической модификации или фармацевтических композициях терапевтических молекул. Большинство молекул

терапевтических препаратов не достигают участка заболевания и применяются только к человеческому организму для достижения необходимой концентрации препарата в крови, при этом не обладая определенной степенью селективности в отношении пораженных тканей. Соответственно, большая часть применяемого препарата выводится из циркуляции крови, не достигнув участка заболевания.

В качестве высокоэффективных и специфических терапевтических средств используется большое количество терапевтических молекул на основе белков и пептидов. Однако их применение ограничивается их физико-химическими свойствами, обусловленными по существу полярной природой аминокислотной композиции и аминокислотной последовательности полярных амидных связей. В частности, их молекулярный размер и заряд белков ограничивают биодоступность, достигающую желаемой цели. Применение терапевтических белков дополнительно осложняется тем обстоятельством, что многие белковые и пептидные препараты имеют свои терапевтические мишени внутри клеток. При этом основной проблемой, которую необходимо решить для того, чтобы найти новые лекарственные средства или технологии доставки лекарственных средств, является проницаемость клеточной мембраны для переноса этих типов лекарственных препаратов в цитоплазму или ядро клеток-мишеней. Хорошо известно, что отдельные молекулы с молекулярной массой более 1 кДа не проникают непосредственно в цитоплазму.

Большое количество диагностических молекул, таких как флуоресцентные красители, контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии, КТ и радиохелаты для радионуклидной визуализации, имеют гидрофильную природу и не способны проникать в клетку, аналогично описанным выше свойствам полипептидов (van der Molen AJ, Eur. J. Radiol. 2008, 66, 168). Таким образом, отсутствует общий доступный способ, который позволяет выбрать диагностическое средство для выявления внутриклеточных путей заболевания и обнаружения взаимодействия терапевтических молекул с внутриклеточными молекулами.

Традиционными способами внутриклеточной доставки являются

электропорация или микроинъекция белков. В данном случае целостность клеточной мембраны нарушается в течение короткого периода времени, обеспечивая внутриклеточную доставку макромолекул с размером большим 1 кДа. Тем не менее, этот способ является инвазивным, и применим только для *in vitro* исследований, но не для клинических условий. Другим недостатком является низкая эффективность процедуры, что можно оценить по количеству опухолевых клеток, нагруженных белком-мишенью. Электропорация или микроинъекция обычно обеспечивает внутриклеточную доставку в приблизительно 20-40% обработанных клеток, однако воспроизводимость является очень низкой.

В последнее время были разработаны новые фармацевтические способы для доставки терапевтических полипептидов, белков и антител в опухолевые клетки. Для внутриклеточной доставки терапевтических белков могут быть использованы фармацевтические наноносители, такие как липосомы, самособирающиеся мицеллярные системы или полимерные наночастицы (Du et al., *Curr Drug Metab*, 2012, 13, 82-92). Они способны устранить эндосомальный метаболизм, но не обладают специфичностью к опухолевой клетке. В связи с этим, для нацеливания указанных наноносителей на опухолевые клетки, могут быть использованы нацеливающие лиганды. Тем не менее, липосомальные и другие композиции в форме наночастиц, несущих терапевтические полипептиды, антитела и белки в сочетании с нацеливающими лигандами (van der Meel et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013, 65, 1284-98), являются дорогостоящими и рассматриваются в качестве сложных химических соединений. Оптимизация этих структур часто осложняется вследствие того, что зависимость между веществом носителя и терапевтической нагрузкой должна быть точно установлена. В отношении диагностических нагрузок, физико-химические свойства диагностического агента должны быть точно приведены в соответствие с носителем аналогичным образом, чтобы получить функциональные химические соединения.

Тем не менее, возможности фармацевтического сочетания с системами носителей в форме наночастиц, использование белков и пептидов в качестве терапевтических агентов затруднено как

такое по всей совокупности присущих им свойств, связанных с их природой в качестве сложных макромолекул, которые являются, как правило, чужеродными для организма-реципиента. Это приводит к низкой стабильности большинства пептидных и, в частности, белковых лекарственных средств при физиологических значениях pH и температурах, в частности, когда эти белки должны быть активными в среде, отличной от нормальной. Различные процессы, ведущие к инактивации различных биологически активных белков и пептидов *in vivo*, включают конформационные превращения белков в неактивную форму под влиянием температуры, pH, высокой концентрации соли или детергентов. Очень часто агрегация белков приводит к нарушению функции и метаболизма, что трудно точно определить в фармацевтических системах наноносителей.

Решение задачи, лежащей в основе настоящего изобретения

Авторы настоящей заявки неожиданно обнаружили способ доставки терапевтических молекул, в частности, полипептидов, в частности, в пораженные заболеванием клетки. Решение задачи основано на неожиданном открытии того, что такие полипептиды и белки могут быть доставлены в опухолевые клетки без фармацевтической композиции на основе наночастиц, полимеров, мицелл или липосом. Альтернативно, было обнаружено, что группа соединений, на основе определенных дендримеров, ковалентно связанных с терапевтическим эффектором, может переноситься в качестве дендримерного конъюгата в клетку-мишень. В частности, было установлено, что тип дендримера, несущий определенное количество сульфатных групп ($-\text{OSO}_3^- \text{M}^+$), может выступать в качестве активной транспортной группы, когда этот дендример ковалентно связан с соответствующим терапевтическим полипептидом или другим типом эффектора, включая терапевтические и диагностические молекулы.

Объектом настоящего изобретения является обеспечение конъюгатов дендримеров, способов их получения и их применение для лечения и диагностики заболеваний.

Терапевтические и диагностические молекулы, которые не проникают в клетки, трудно проникают в нормальные клетки, и направлены только на те клетки, которые имеют механизмы

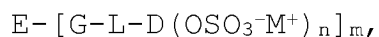
захвата, основанные на трансмембранных транспортерах растворенных веществ, тем самым повышая селективность и снижая токсичность для организма. Удивительно и неожиданно конъюгаты дендримеров, в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивают трансмембранную доставку терапевтически активных молекул посредством транспортных белков. Было установлено, что терапевтически активные молекулы, а также диагностические молекулы, которые в виде отдельных соединений сами по себе не могут захватываться в клетки в связи с описанными выше свойствами, являются неожиданно применимыми для транспортировки в клетки и демонстрируют терапевтический или диагностический эффект непосредственно в клетке. Кроме того, специфическое нацеливание на клетки в организме обеспечивается конъюгатами дендримеров согласно изобретению. В этом контексте определенные конъюгаты дендримеров позволяют повысить биодоступность и селективность широкого спектра терапевтических и диагностических эффекторных молекул, включая полипептиды, а также терапевтических средств на основе небольших молекул. Терапевтические и диагностические молекулы, которые не способны проникать в клетки, транспортируются в клетки с использованием транспортных белков. Удивительно и неожиданно, это может быть достигнуто за счет однородности по молекулярной массе каждого дендримера в заявленных конъюгатах, в сочетании с ковалентной конъюгацией между эффекторными молекулами и сульфатированными дендримерами.

Фармацевтическая композиция с терапевтической молекулой, физически встроенной или инкапсулированной в частице носителя или полимера (без ковалентного связывания с носителем) показала недостаток в том, что терапевтические эффекторные молекулы могут перераспределяться в организме путем распада носителя и/или утечки из носителя, тем самым демонстрируя свою исходную токсичность для организма. Соответственно, диагностические молекулы могут перераспределиться, при этом генерируя сигналы, которые обеспечивают эксперту обнаружение неправильного состояния молекулы, не связанное с механизмом захвата.

Подробное описание изобретения

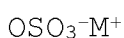
Описанные признаки изобретения подтверждаются следующими описаниями типичных вариантов осуществления, которые представлены с целью раскрытия настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

Объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы



где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу,

в которой $D(OSO_3^-M^+)_n$ представляет собой дендример D, несущий количество n сульфатных групп



где количество n сульфатных групп выбрано из диапазона от 6 до 96,

где M представляет собой катионный неорганический или органический противоион к анионной сульфатной группе, где L представляет собой линкер или спейсер между D и E,

где G представляет собой соединительную функциональную группу, образующую соединение между L и E, и где m представляет собой целое число от 1 до 20.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, содержащий полисульфатированный дендример D и терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу E, которая ковалентно связана с указанным полисульфатированным дендримером.

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где каждый из дендримеров D указанного конъюгата имеет аналогичную молекулярную массу. В варианте осуществления изобретения дендримерные структуры имеют определенную и уникальную молекулярную массу. Подразумевается, что полученный конъюгат не состоит из множества различных дендритных молекул, каждая из которых имеет другую структуру, ветвление, размер, заряд, объем или полярность, что является результатом полимерной природы. В WO2011/095311 описано использование конъюгатов терапевтических белков с

сульфатированными полиолами, где эти сульфированные полиолы имеют полимерную природу с молекулярной массой, отличной от определенной. Они характеризуются средней молекулярной массой, исходя из полидисперсности, статистической конъюгацией с терапевтическими молекулами. Было неожиданно обнаружено, что определенная система дендримеров (сульфатные группы 24, 32 или 48) с определенным линкером, конъюгированным с белком-токсином, обеспечивает более высокую эффективность при лечении опухолевых клеток в культуре клеток по сравнению с полидисперсным полиглицеринсульфатом с сопоставимой средней молекулярной массой (см. пример 19).

Удивительно и неожиданно, еще одно преимущество использования определенных дендримерных систем с одной молекулярной массой, по сравнению с полимерным сульфатированным полиглицерином, может быть установлено в соответствии с настоящим изобретением. После мечения флуоресцентным красителем (ICC), с получением, например, соединения примера 8 (**ICC-D01**, **ICC-D12**, **ICC-D18**), проводили исследования клеточного захвата в сравнении с полимерным ICC-полиглицеринсульфатом (средняя молекулярная масса 12000 Да). **ICC-D01**, **ICC-D12**, **ICC-D18** обеспечивали внутриклеточное распределение в цитозоле, при этом полимерный ICC-полиглицеринсульфат показал существенную локализацию дополнительно в эндосомальных компартментах, вероятно вследствие частичного эндоцитозного захвата полимерной смеси. Эндоцитозный захват для полимеров становится преобладающим выше 20 кДа, а также описан в WO2011/095311 для сульфатированных полимеров. В общем случае захват терапевтических белков эндосомным компартментом требуется избегать по основным причинам. Во-первых, эндосомная мембрана представляет собой барьер для транслокации терапевтических эффекторных молекул к цитозолю. Обычно терапевтические эффекторные молекулы становятся недоступными при терапевтических целевых молекулах в цитозоле. Во-вторых, многие метаболизирующие и каталитические ферменты могут разрушать терапевтические эффекторные молекулы, прежде чем они могут быть транслоцированы в цитозоль. Этот аспект имеет особое значение

для белковых терапевтических эффекторных молекул. Синтез полиглицеринсульфатов, включающий анионную полимеризацию с раскрытием цикла для синтеза полиглицеринового каркаса, известен из существующего уровня техники, обычно, приводя к определенному молекулярно-массовому распределению около средней молекулярной массы M_n с индексом полидисперсности 1,5–1,8 (Gröger et al, Bioconjug. Chem. 2013, 24, 1507–14). Таким образом, для средней молекулярной массы M_n в диапазоне 5–10 кДа с индексом полидисперсности 1,5–1,8 всегда присутствует значительное количество высокомолекулярных структур (>20 кДа) в смеси, которые трудно поддаются количественной оценке. Соответственно, в примере 18, очевидная независимость от эндоцитоза является выраженной только для белковых конъюгатов с сульфатированными дендримерами (Asp-d02), а не для конъюгатов с полиглицерилсульфатом.

Кроме того, специалисту в данной области техники известны способы подтверждения того, что каждый дендример имеет аналогичную молекулярную массу, например, такие как ¹H-ЯМР-спектроскопия, ¹³C-ЯМР-спектроскопия, элементный анализ, масс-спектроскопия, которые являются типичными способами, используемыми в органической химии.

В конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где количество n сульфатных групп является одинаковым для каждого дендримера D. Таким образом, каждый дендример указанного конъюгата может охватывать только одно определенное количество n сульфатных групп, например, только 6 или только 8 или только 12 или только 16 сульфатных групп, при этом количество n сульфатных групп выбирается из диапазона от 6 до 96.

Кроме того, объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где сульфатные группы OSO₃⁻M⁺, предпочтительно, получают из гидроксильных групп, которые преобразуют в сульфатные группы (моностеры сульфоновой кислоты) посредством процесса сульфатирования.

Предпочтительными агентами для проведения процесса

сульфатирования гидроксильных групп являются комплексы триоксида серы (такие как SO_3 -пиридиновый комплекс, SO_3 -триэтиламиновый комплекс, SO_3 -триметиламиновый комплекс, SO_3 -ДМФ комплекс) или сульфаминовой кислоты (Mol JA et al., Carbohydr Res. 2003 338:1397-401).

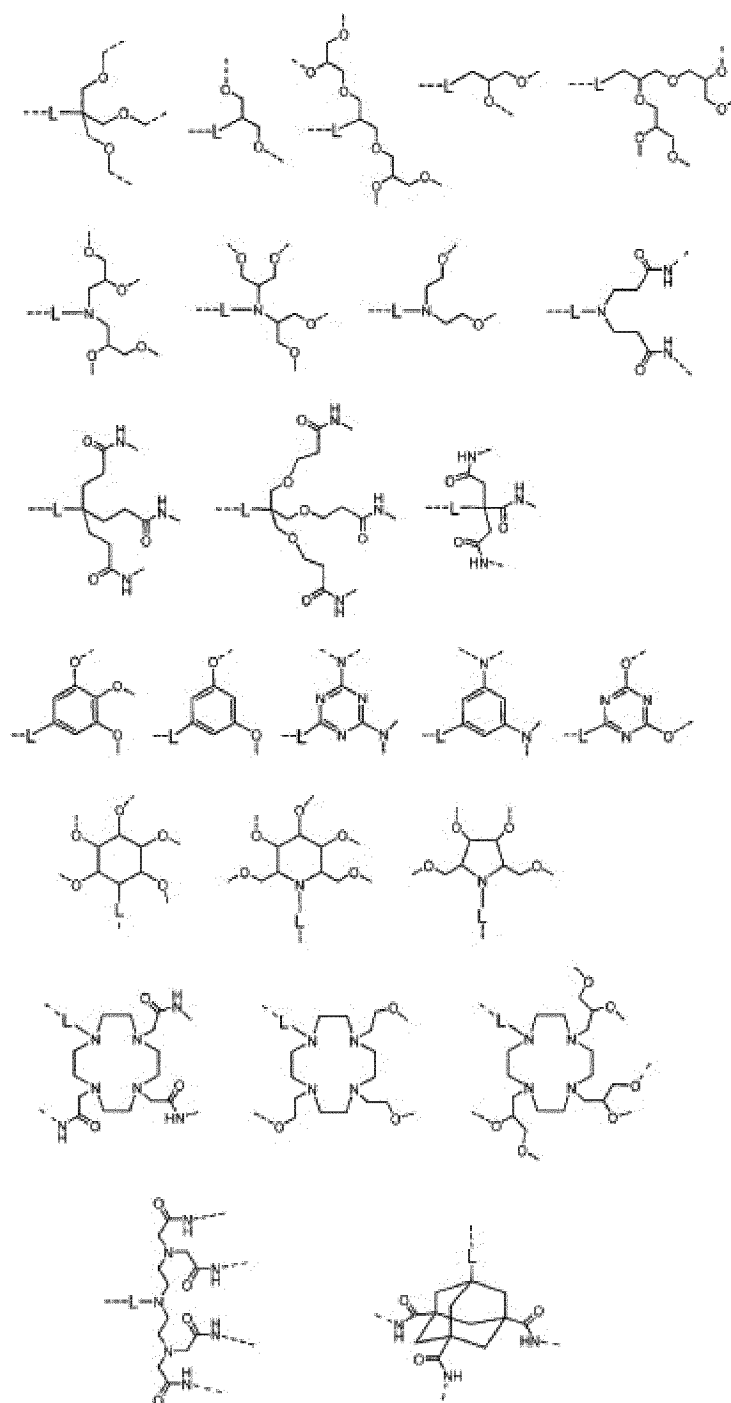
В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где повторяющиеся звенья мономеров для построения дендритной структуры выбраны из группы, состоящей из 1,2-замещенного глицерина, 1,3-замещенного глицерина, пентаэритрита, глюкозы, маннозы, галактозы, лизина, трис (гидроксиметил) аминметана, трис (пропионовая кислота) аминметана, 1,1'-бис (гидроксиметил) пропионовой кислоты, янтарной кислоты, глутаровой кислоты, малеиновой кислоты, гликолевой кислоты, дигликолевой кислоты, адипиновой кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, (2-аминоэтил) амида пропионовой кислоты, пропиленмина, этиленмина, пропиленоксида, этиленоксида.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где связь мономеров в дендимере основана на функциональных группах, выбранных из эфира, тиоэфира, эфира карбоновой кислоты, эфира сульфониловой кислоты, сульфонамида, карбоксиламида, амина, карбамата, тиокарбамата, мочевины, тиомочевины, гидразона, имида, дисульфида, фосфата, фосфоната, триазола, ацетала, кетала.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $\text{E}-[\text{G}-\text{L}-\text{D}(\text{OSO}_3^- \text{M}^+)_n]_m$, где дендимер D содержит звено центрального дендимерного ядра (CDCU) с ковалентным присоединением линкерного звена. CDCU включают структуры, выбранные из пентаэритрита, глицерина, триглицерина, глицеринамина, трис (пропионовая кислота) метила, трис (гидроксиметил) метила, тетраоксаспиро (5,5) ундекана, адамантила.

Предпочтительными являются структуры, где звенья центрального дендимерного ядра (CDCU) с ковалентным присоединением линкерного звена содержат структуры, такие как

пентаэритритол, глицерин, триглицерин, глицеринамин, трис (пропионовая кислота) метил и структуры, как показано ниже.



В другом конкретном варианте осуществления объектом настоящего изобретения является конъюгат, где D содержит концевые группы, выбранные из 1,2-дисульфатоалкила, 1,3-дисульфатоалкила, N,N'-ди(1-сульфатоалкил) амина, трис (сульфатометил) метила, 1,2,4-трисульфато-3-алкила, 1,2,3,4,5-пентасульфатоалкила, полученного из глюкозамина.

Для достижения высокой плотности сульфатных групп, положение их алкильных групп должны быть такими, чтобы они находились в непосредственной близости друг к другу. Это может быть достигнуто за счет структурных мотивов 1,2-дисульфатоалкила, 1,3-дисульфатоалкила, N,N'-ди(1-сульфатоэтил)амин. Существуют возможные различные структуры, которые включают 1,2-дисульфато- или 1,3-дисульфато структурные мотивы. К таким структурам относятся также фрагменты сахаров или гликанов, которые, после сульфатации, содержат в структуре также 1,2-дисульфато- или 1,3-дисульфато единицы. Допустимыми являются моно-, ди- или олигогликановые фрагменты, и в пределах этих структур, допустимы циклические структуры или структуры с открытой цепью (восстановленные). В объем настоящего изобретения включены 1,2,3,4,5-пентагидроксигексильные структуры на основе гексозных (глюкоза, галактоза, манноза) сахаров, таких как глюкозамин или глюкамин. D-глюкамин может быть использован в дендримерных системах, что дает 5 сульфатных групп на глюкаминный остаток. Другой объем включает циклодекстрины (α , β или γ -циклодекстрины), которые являются монофункционализированными (такие как 6-дезоксиг-6-азидо-циклодекстрины или другие функциональные группы, хорошо известные специалисту в данной области; Roux M et al., Eur Biophys J. 2007, 36, 861-7), для связывания линкера L, и могут быть модифицированы на каждой гидроксильной группе с глицерином с последующей сульфатацией.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются дендримеры D с концевым 1,2,3,4,5-пентасульфато звеном, производным сахаров, предпочтительно глюкозамина, дендримеры D с концевым 1,2-дисульфато звеном, производным более мелких гидроксильных звеньев, включающих глицериновые структуры, дендримеры D с концевыми 1,3-дисульфато звеньями, производными бис(гидроксиметил)алкильных фрагментов. Более предпочтительной в качестве структурного элемента в D, является 1,2-дисульфатоалкильная структура на основе концевой 1-замещенной

1,2-дисульфатопропила, производного глицеринового звена.

В контексте этого варианта осуществления 1,2-замещенный глицерин означает что две смежные гидроксильные группы образуют связь с последующим мономерным звеном оболочки следующей генерации в структуре дендримеров. 1,3-замещенный глицерин означает, что две внешние гидроксильные группы образуют указанное соединение.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где D содержит сульфатные группы, где сульфатные группы являются особенно предпочтительными по сравнению с сульфонатными и карбоксилатными группами, которые, как известно, используются в дендритных полимерах и дендримерах (Weinhart et al., *Biomacromolecules*. 2011, 12, 2502). Как было опубликовано, сульфонатные и карбоксилатные группы могут быть введены в молекулу дендримера, модифицируя гидроксильные или амино группы с помощью, например, сукцинилангидрида, бромуксусной кислоты, 1,3-пропансультона, 1,4-бутансультона. Удивительно, но сульфатные дендримеры демонстрируют более эффективный клеточный захват (обнаруживаемый с помощью флуоресцентно меченых конъюгатов) также для меньших молекулярных масс (количество анионных групп <24) по сравнению с карбоксилатными и сульфонатными группами.

В более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где линкерное звено L ковалентно присоединено к дендримеру D.

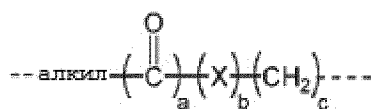
В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где линкерное звено L ковалентно связано с "сердцевинной" дендримера D в положении, в результате чего из этой сердцевины выращивают дендример с образованием своей дендритной структуры.

Дополнительно объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где L представляет собой C_{4-100} -алкильную группу.

В одном из вариантов осуществления объект по настоящему

изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где L представляет собой C_{4-100} -алкильную группу, где C_{4-100} -алкильная группа выбрана из группы, состоящей из алифатических циклических, разветвленных или линейных звеньев, в которых одна или несколько метиленовых групп могут быть независимо заменены звеном, выбранным из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(-Q)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O-M⁺)O, P(=O)(O-M⁺)O, арилена, этенилена или этинилена и триазилилена, в котором любой атом водорода может быть независимо заменен метилом, этилом или гидроксиметилом.

Дополнительный объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где структура L представляет собой



где алкил представляет собой C_{4-100} -алкильную группу, в которой одна или несколько групп могут быть заменены группой, выбранной из группы, состоящей из алифатических циклических, разветвленных или линейных звеньев, в которых одна или несколько метиленовых групп могут независимо быть заменены звеном, выбранным из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O-M⁺)O, P(=O)(O-M⁺)O, арилена, этенилена или этинилена и триазилилена, в котором любой атом водорода может быть независимо заменен метилом, этилом или гидроксиметилом, X представляет собой NH, S или O, и a, b и c могут быть независимо равны 0 или 1 (исключено a+b+c=0).

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где L представляет собой C_{4-50} -алкильную группу, в которой от одной до десяти метиленовых групп заменены группой, выбранной из группы, включающей O, C(=O)NH, OC(=O)NH,

$\text{OC}(=\text{O})\text{O}$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHC}(=\text{S})\text{NH}$, триазол, где X представляет собой NH или O , и a , b и c могут быть независимо равны 0 или 1 (исключено $a+b+c=0$).

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $\text{E}-[\text{G}-\text{L}-\text{D}(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n]_m$, где L представляет собой алкил, включающий C_4-C_{18} углеродную цепь, звено $\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ и короткую ПЭГ цепь с повторяющимися звеньями $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ в количестве до 10, в котором связывающая группа G размещается на конце этой цепи в качестве реакционноспособной группы для ковалентной конъюгации с E .

В конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $\text{E}-[\text{G}-\text{L}-\text{D}(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n]_m$, где L содержит структуры, которые расщепляются во внутриклеточных условиях, где расщепляемые структуры выбраны из группы, включающей дисульфид ($\text{S}-\text{S}$), расщепляемые кислотной структуры $\text{CH}=\text{N}$, $\text{CH}=\text{N}-\text{NH}$, $\text{CH}=\text{N}-\text{NHC}(=\text{O})$, $\text{C}=\text{N}-\text{O}$, в которой любой атомом азота или углерода может быть замещен этилом или метилом. Другая структура, которая расщепляется во внутриклеточных условиях, включает аминокислотные последовательности от 2 до 10 аминокислот.

В более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы, где L содержит структуры, которые демонстрируют оптический пик в ия при УФ и видимой области спектра в диапазоне от 280 до 650 нм, предпочтительно от 300 до 550 нм.

В еще более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $\text{E}-[\text{G}-\text{L}-\text{D}(\text{OSO}_3^-\text{M}^+)_n]_m$, где L содержит структуры, использующие, по меньшей мере, два ароматических или бисароматических фрагмента, такие как дифенил, нафтил, дибензокетон, дансил, пирен, перилен, кумарин, 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен или цианиновый краситель, предпочтительно индодикарбоцианиновый или монометин хромофорные фрагменты. Спектроскопический метод количественного анализа позволяет определить соотношение дендримера и белка/полипептида. Примеры структур L , обнаруживаемых в УФ и видимой области спектра, связанных с D ,

описаны в примере 9 и 10.

Далее объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^+M^+)_n]_m$, где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу.

Использование сульфатированного дендримера, ковалентно конъюгированного с флуоресцентным красителем, описано Paulus et al. (Macromol. Biosci. 2014, 14, 643-654). [G4.0]-дендример получают из полиола, содержащего 64 гидроксигруппы, с которым линкер статистически конъюгирован, с последующей сульфатацией и мечением красителем. Такая схема дает несовершенную структуру, поскольку линкерный фрагмент не может быть помещен в желаемое положение точно в соотношении 1:1. Публикация описывает их захват и полимерный полисульфат с меньшей степенью разветвления в опухолевые клетки, и описывает оптимальной захват с умеренной степенью разветвления, составляющей 60% (несовершенная дендримерная структура). В этой публикации отсутствует информация о механизме захвата и можно ли использовать транспортер-опосредованный путь для транспортировки терапевтически активных молекул, с тем чтобы сделать их доступными для внутриклеточного взаимодействия с молекулярным механизмом заболевания.

В конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^+M^+)_n]_m$, где E представляет собой терапевтическую молекулу эффектора.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где эффекторная молекула содержит вещества, которые могут нарушать внутриклеточные механизмы пролиферации, апоптоза, синтеза вещества соединительной ткани (например, коллаген, фибронектин), иммунной функции, старения или иммунной защиты.

Более конкретно, нарушение внутриклеточных механизмов заболевания включает конъюгат сульфированных дендримеров и терапевтических молекул для использования в обработке клеток путем транспортировки конъюгата в клетку, и тем самым локализуя терапевтическую эффекторную молекулу E в клетке, где эта

молекула E взаимодействует непосредственно с молекулярными механизмами заболевания. Это взаимодействие основано на прямом связывании с молекулами в клетке, индуцируя, таким образом, нарушение или изменения в биологических сигнальных путях. Связывание определяется связывающей силой или аффинностью связывания, которая зависит от молекулярной природы и структуры терапевтической эффекторной молекулы (что дополнительно показано в разделах ниже).

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при обработке клеток, которые имеют механизмы захвата, основанные на транспортных белках из группы трансмембранных транспортеров растворенных веществ, которые обеспечивают трансмембранную доставку терапевтически активных молекул посредством трансмембранных транспортеров растворенных веществ в клетки. Эти трансмембранные транспортеры растворенных веществ предпочтительно содержат белки-транспортеры органических анионов (OATPs; Liu T et al., J. Drug Target. 2014, 22, 14-22). Предпочтительным вариантом являются OATP с опухолеспецифичной экспрессией, включая OATP1B1, OATP1B3 или NTCP (Buxhofer-Ausch et al., J Drug Deliv. 2013, 863539).

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при лечении и диагностике рака, где указанные конъюгаты сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул направлены против молекулярных мишеней в клетках злокачественной опухоли. Типы клеток злокачественной опухоли предпочтительно включают высокую экспрессию OATP1B1, OATP1B3 или NTCP для лечения злокачественной опухоли, такой как злокачественная опухоль поджелудочной железы, злокачественная опухоль легких, злокачественная опухоль ЦНС, меланома, злокачественная опухоль толстой кишки, злокачественная опухоль кожи, злокачественная опухоль молочной железы, злокачественная опухоль почки, злокачественная опухоль печени. Другим

предпочтительным вариантом осуществления является лечение злокачественной опухоли стволовых клеток, которые часто экспрессируют высокие уровни OATP1B1, OATP1B3 или NTCP.

Таким образом, объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при лечении и диагностике заболеваний, где указанные конъюгаты сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул проникают в клетки с помощью транспортных белков и взаимодействуют внутри клетки с молекулярными механизмами заболевания.

Еще более предпочтительным является конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при обработке клеток, которые имеют механизмы захвата, основанные на транспортных белках из группы трансмембранных транспортеров растворенных веществ, и которые в ином случае не способны захватывать указанные терапевтические молекулы (смотри также пример 18). Удивительно, что терапевтические эффекторные молекулы могут накапливаться или концентрироваться внутри клетки-мишени с использованием механизма захвата конъюгатов посредством транспортных белков, что было невозможно ранее, поскольку эти терапевтические молекулы не способны достичь целевой молекулы, к которой она демонстрирует аффинность связывания.

Таким образом, объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при лечении и диагностике заболеваний, где указанные конъюгаты сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул захватываются клетками с помощью транспортных белков, взаимодействуют внутри клетки с молекулярными механизмами заболевания и накапливаются в клетке вследствие аффинности связывания терапевтической эффекторной молекулы к внутриклеточной целевой молекуле. Внутриклеточные цели обоснованы дополнительно ниже.

В другом конкретном варианте осуществления объект по

настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где эффекторные молекулы выбраны из группы, включающей малые молекулы, пептиды, белки, гликаны, нуклеиновые кислоты. Предпочтительными являются эффекторные молекулы этих классов, которые не переносятся в клетки сами по себе.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где малая молекула выбрана из группы, включающей пептид или пептидомиметические структуры, включая циклические пептиды или с открытой цепью пептиды с природными или неприродными структурными модификациями. Было неожиданно показано, что гидрофильные пептиды, которые не захватываются клетками, могут локализовываться в опухолевых клетках после конъюгации с дендримерами по настоящему изобретению.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где белки выбраны из группы, включающей глобулярные белки, гликопротеины, токсины, ферменты, антитела, фрагменты антител, сконструированное антитело и белковые конструкции, включая однодоменные антитела (sdAb), одноцепочечные Fv антитела (ScFv), одноцепочечные Fv-Fc антитела (ScFv-Fc).

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где белки выбраны из группы, включающей миметики антител, которые, как антитела, могут специфически связывать антигены, но которые структурно не связаны с антителами. Особенно предпочтительными являются миметики антител, выбранные из группы, включающей аффитела, аффилины, авимеры, антикалины, дарпины, домены Кунитца, финотела, полипептиды на основе домена фибронектина III типа.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где нуклеиновые кислоты включают РНК, ДНК, миРНК, мРНК, антисмысловую РНК, микро РНК или сконструированные форматы, такие как аптамеры.

В другом конкретном варианте осуществления объект по

настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где Е направлен против молекул, вовлеченных в пролиферацию и апоптоз опухолевых клеток. Более конкретно, эти молекулы локализованы в опухолевой клетке, предпочтительно в пределах цитоплазмы опухолевых клеток.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где Е выбран из группы, включающей полипептиды или низкомолекулярные эффекторные молекулы, которые связывают мишени, такие как Fox01, HDAC, DP-1, E2F, ABL, AMPK, BRK, BRSK1, BRSK2, BTK, CAMKK1, CAMKK альфа, CAMKK beta, Rb, Suv39H1, SCF, p19INK4D, GSK-3, p18 INK4, мус, cyclin E, CDK2, CDK9, CDG4/6, Циклин D, p16 INK4A, cdc25A, BMI1, SCF, Akt, CHK1/2, CK1 delta, CK1 гамма, CK2, CLK2, CSK, DDR2, DYRK1A/2/3, EF2K, EPH-A2/A4/B1/B2/B3/B4, EIF2AK3, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, p53, p21 Cipl, PAX, Fyn, CAS, C3G, SOS, Tal, Raptor, RACK-1, CRK, Rap1, Rac, KRas, NRas, HRas, GRB2, FAK, PI3K, spread, Spry, mTOR, MPK, LKB1, PAK 1/2/4/5/6, PDGFRA, PYK2, Src, SRPK1, PLC, PKC, c-Raf, PKA, PKB альфа/beta, PKC альфа/гамма/zeta, PKD, PLK1, PRAK, PRK2, RIPK2, B-Raf, WAVE-2, TSC2, DAPK1, BAD, IMP, C-TAK1, TAK1, TAO1, TBK1, TESK1, TGFBR1, TIE2, TLK1, TrkA, TSSK1, TTBK1/2, TTK, Tpl2/cot1, MEK1, MEK2, PLD1, Erk1, Erk2, Erk5, Erk8, p90RSK, PEA-15, SRF, p27 KIP1, TIF1a, HMGN1, ER81, MKP-3, c-Fos, FGF-R1, GCK, GSK3 beta, HER4, HIPK1/2/3/, IGF-1R, cdc25, UBF, LAMTOR2, Stat1, Stat3, CREB, JAK, Src, PTEN, NF-kappaB, HECTH9, Bax, HSP70, HSP90, Apaf-1, Cyto c, BCL-2, Bcl-xL, Smac, XIAP, Каспаза-9, Каспаза-3, Каспаза-6, Каспаза-7, CDC37, TAB, IKK, TRADD, TRAF2, R1P1, FLIP, TAK1, JNK1/2/3, Lck, A-Raf, B-Raf, C-Raf, MOS, MLK1/3, MNK1/2, MSK1, MST2/3/4, MPSK1, MEKK1, ME K4, MEL, ASK1, MINK1, MKK1/2/3/4/6/7, NEK2a/6/7, NUA1, OSR1, SAPK, STK33, Syk, Lyn, PDK1, PHK, PIM1/2/3, Атаксин-1, mTORC1, MDM2, p21Waf1, Cyclin D1, Lamin A, Tpl2, Мус, catenin, Wnt, IKK-beta, IKK-гамма, IKK-альфа, IKK-epsilon, ELK, p65RelA, IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRR, FADD, TRAF6, TRAF3, MKK3, MKK6, ROCK2, RSK1/2, SGK1, SmMLCK, SIK2/3, ULK1/2, VEGFR1, WNK1, YES1, ZAP70, MAP4K3, MAP4K5, MAPK1b, MAPKAP-

K2/K3, p38 альфа/beta/delta/гамма MAPK, Aurora A, Aurora B, Aurora C, MCAK, Clip, MAPKAPK, FAK, MARK1/2/3/4, Muc1, SHC, CXCR4, Gap-1.

Более конкретно, целевой катенин демонстрирует транскрипционную активность, которая основана на взаимодействии с несколькими кофакторами и адапторными белками для формирования комплекса фактора транскрипции. Комплекс транскрипции катенина представляет собой несколько белок-белок взаимодействий, которые могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней. В качестве терапевтических лидерных структур могут быть использованы пептидные мотивы на основе аминокислотной последовательности взаимодействующих белковых структур, таких как альфа-спирали или бета-складчатый слой. В качестве ингибиторов комплекса транскрипции катенина предпочтительно используют альфа-спиральные пептиды на основе Bcl9, bcl9/2 или p90Rsk.

Более конкретно, апоптоз (запрограммированная смерть клеток) опухолевых клеток подавляется членами семейства bcl-2, такими как bcl-2, bcl-x1 и mcl-1. Индуцирование апоптоза рассматривается как очень привлекательный подход к терапии опухолей. Из литературы известно, что взаимодействие негативных регуляторов апоптоза, таких как bcl-2, bcl-x1 и mcl-1 с белками сенсibilизации апоптоза, такими как BIM, BID, NOXA, PUMA может индуцировать апоптоз и гибель клеток опухоли. Пептидные мотивы на основе аминокислотной последовательности взаимодействующих белковых структур, таких как альфа-спирали или бета-складчатый слой, могут быть использованы в качестве терапевтических лидерных структур. Альфа-спиральные пептиды на основе белков сенсibilизации апоптоза, например, BIM, BID, NOXA, PUMA, предпочтительно используют в качестве ингибиторов белков, которые подавляют апоптоз, например, bcl-2, bcl-x1 и mcl-1.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где E представляет собой фермент, причем фермент представляет собой терапевтический фермент, включая противоопухолевые ферменты, действующие путем разрушения

некоторых аминокислот, необходимых для роста опухоли; ферменты, действующие путем разрушения олигонуклеотидных цепей, ферменты для заместительной терапии (обычно, пищеварительные ферменты) для коррекции различных недостатков желудочно-кишечного тракта; ферменты для лечения лизосомные болезни накопления; ферменты для тромболитической терапии; антибактериальные и противовирусные ферменты, а также противовоспалительные и гидролитические ферменты.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой токсический полипептид из класса модифицированных растений и бактериальных токсинов.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой токсический полипептид из класса модифицированных растений и бактериальных токсинов, где эти токсический полипептиды принадлежат к классу рибосомных ингибирующих белков и структурно полученных последовательностей для ингибирования роста опухоли.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой токсический полипептид из класса модифицированных растений и бактериальных токсинов, где токсические полипептиды содержат дифтерийный токсин, дифтерийный токсин, лишенный рецептор-связывающей активности, экзотоксин синегнойной палочки A; процессированные формы экзотоксина синегнойной палочки, у которого отсутствует рецептор-связывающий домен Ia, токсин-рицин, сапорин, диантин, гелонин, трикозантин, противовирусный белок лаконоса (PAP), буганин, протективный антиген сибирской язвы, альфа токсин, абрин, апоптоз-индуцирующие полипептиды.

В наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E включает белки, выбранные из дикого типа p53, дикого типа p21, апоптоз-индуцирующий фактор 1 (AIF1), ASK1, апоптоз-индуцирующий белок (AIP), каспазы-2,

каспазы-3, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8 каспазы-9, каспазы-10, Вах, серин-протеазы, Snac, цитохрома с, Аraf-1, апоптоина.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой полипептид, нацеленный на механизмы митоза для ингибирования роста опухоли.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой токсические полипептиды, выбранные из группы, содержащей дезоксирибонуклеазу I (ДНКазу I), дезоксирибонуклеазу II (ДНКазу II), полипептиды, нацеленные на альфа-тубулин, полипептиды, нацеленные на бета-тубулин, полипептиды, нацеленные на динеин, конъюгаты полипептиды, нацеленные на кинезин, полипептиды, нацеленные на NEDD1, полипептиды, нацеленные на трансформирующий кислый биспиральный белок TACC, полипептиды, нацеленные на сверхэкспрессированный ген опухоли толстой кишки и печени chTOG.

Повышение уровня знаний о структурах токсинов и механизмах действия приводит к новым химическим соединениям, которые присутствуют в настоящее время в доклинических и клинических исследованиях. Большинство натуральных белков токсинов могут быть разделены на три основные группы: (1) токсины, которые повреждают клетки, нарушая целостность мембран, (2) токсины, которые нарушают нормальную электрическую активность нервной интоксигированного организма, (3) токсины, которые нарушают или препятствуют клеточным процессам и могут оказывать влияние на клетки-мишени посредством ферментативных или безферментативных активностей. Некоторые члены третьей группы представляют собой чрезвычайно токсические полипептиды, которые обладают способностью самостоятельной транслокации в цитоплазму клетки, где они осуществляют свою активность, которая, в большинстве случаев, приводит к смерти клеток, подвергшихся интоксикации. Однако клиническое применение сконструированных токсинов до сих пор сталкивалось со многими проблемами. Две основные проблемы, связанные с системным введением иммунотоксинов, представляют

собой (1) отсутствие специфичности вследствие присутствия целевого антигена/рецептора, также присутствующего на здоровой ткани, и (2) нежелательную интоксикацию здоровой ткани вследствие связывания иммунотоксина с компонентами клеточной поверхности, а не конкретно со своим целевым антигеном/рецептором ("токсичность, независимая от мишени"). Таким образом, в одном из вариантов осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$ с токсическими полипептидами или токсинами для лечения пролиферативного заболевания путем внутриклеточной доставки этих видов терапевтических эффекторов.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где сульфатированные дендримеры химически конъюгированы с антителами, фрагментами антител или сконструированными белками и обеспечивают внутриклеточную доставку в пролиферативные клетки, такие как опухолевые и воспалительные активированные клетки.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где терапевтические эффекторныe молекулы E имеют молекулярную массу, равную или ниже 100 кДа, более предпочтительно ниже 80 кДа, еще более предпочтительно ниже 60 кДа, что может быть достигнуто путем конъюгации сульфатированных дендримеров с фрагментами антител, выбранных из ScFv, scFv2, Fab, однодоменного антитела, антитела, bite-антитела или диатела, и наиболее предпочтительно ниже 40 кДа., что может быть достигнуто путем конъюгации сульфатированных дендримеров с фрагментами антител, выбранных из ScFv, однодоменного антитела или синтетических пептидов с низкой молекулярной массой.

В группу синтетических пептидов включены нециклические пептиды, циклические пептиды, полученные путем N/C-концевой циклизации, циклические пептиды, полученные путем цистеин-цистеин (дисульфид) циклизации, и пептиды с алифатическими циклами, связанными неприродными аминокислотами (например, волокнистые пептиды), включающие до 25 аминокислот,

предпочтительно, до 20 аминокислот, более предпочтительно до 15 аминокислот, наиболее предпочтительно до 10 аминокислот.

Более длинные пептиды, включающие до 30-40 аминокислот, также являются объектом настоящего изобретения, в частности, поскольку дополнительные аминокислоты могут быть использованы с целью пространственного распределения, введения растворимости и придания улучшенной стабильности.

Другой вариант осуществления в объеме вышеописанных синтетических пептидов предпочтительно относится к структурным мотивам на основе природных связывающих пептидов, участвующих в белок-белок взаимодействии и использовании последовательностей, образующих специфические альфа-спирали. В частности, эти альфа-спиральные пептидные последовательности характеризуются определенной спиральностью в растворе, образуя таким образом аффинность связывания с другими белками. Необходимая степень спиральности зависит от применяемой структуры пептида (Bernal F et al.. Methods Mol. Biol. 2014, 1 1 76, 107-14), и может быть определена специалистом в данной области, например, с помощью спектроскопии кругового дихроизма или Н-ЯМР (Bonache MA et al, ACS Comb Sci. 2014, 16, 250-258). Спиральность приведена в [%].

Таким образом, объект изобретения представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, где E представляет собой альфа-спиральный пептид, направленный против взаимодействий белок-белок, или молекул, участвующих в пролиферации и апоптозе опухолевых клеток, где конъюгат локализован в опухолевой клетке, предпочтительно в пределах цитоплазмы опухолевых клеток. Предпочтительными являются конъюгаты с n, равным 1. Предпочтительными являются синтетические пептиды, содержащие до 40 аминокислот, предпочтительно до 30 аминокислот, более предпочтительно до 20 аминокислот, образующих альфа-спираль в водном растворе. Альфа-спираль может быть стабилизирована за счет использования неприродных аминокислот в последовательности, и/или путем формирования циклических пептидов (например, но ими не ограничиваясь, циклизация по типу "голова к хвосту", дисульфидная циклизация, углеводородная

сшивка). Предпочтительные значения спиральности этих пептидов выше 40%, более предпочтительно выше 60%, еще более предпочтительно более 80%.

Настоящее изобретение также относится к удивительному открытию в отношении молекулярной массы терапевтических эффекторных молекул, в частности, из группы полипептидов или белков. Неожиданно было обнаружено, что сульфированные дендримеры, химически конъюгированные с антителами, фрагментами антител или сконструированные белки, обеспечивают внутриклеточную доставку в пролиферативные клетки, такие как опухолевые клетки. Антителами типа IgG являются белки со средней молекулярной массой 150 кДа и, обычно, неспособные проникать в цитоплазму. Степень внутриклеточного захвата конъюгатов дендримеров с антителами исследовали на серии различных линий опухолевых клеток и определяли методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), а также методом флуоресцентной микроскопии. Было установлено, что уже через 3 часа после начала инкубации опухолевых клеток с конъюгатами дендримера с IgG присутствовал внутриклеточный захват. Количество положительных клеток, а также общая степень захвата повышалась при инкубации опухолевых клеток с конъюгатами дендримера с IgG в течение 24 часов. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что молекулярная масса терапевтических белков имеет решающее значение с точки зрения кинетики захвата. Более подробно, конъюгаты дендримеров с белком с общей молекулярной массой ниже, чем 150 кДа, демонстрируют быстрый внутриклеточный захват и более высокое относительное количество положительных клеток, чем полный IgG с молекулярной массой 150 кДа. Фрагменты антител, такие как (Fab)₂, ScFv-Fc или диатело, представляют собой белки со средней молекулярной массой 100-120 кДа. Наиболее активный внутриклеточный захват присутствует при конъюгатах дендримера с белком с молекулярной массой ниже 40 кДа, таким как однодоменные антитела (15 кДа). Специалист в данной области может определить степень внутриклеточного захвата опухолевыми клетками путем измерения методом сортировки клеток с

активированной флуоресценцией в различные моменты времени после начала инкубации (смотри также пример 15).

В одном из вариантов осуществления объектом по настоящему изобретению являются конъюгаты дендримеров, где указанные конъюгаты дендримеров представляют собой конъюгаты с би-, три- или мульти- специфическими антителами, фрагментами антител или сконструированными белками, где указанные белки направлены на более чем одну молекулярную мишень и могут вызывать терапевтические эффекты в отношении различных механизмов заболевания одновременно.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E включает полипептиды, которые содержат одну или несколько последовательностей ядерной локализации (NLS) в своей аминокислотной последовательности, которые, как известно, метят полипептид, обеспечивая таким образом перенос в ядро клетки с помощью ядерного транспорта, например, с использованием рецептора импорта. NLS известны специалисту в данной области (см. Lange и др., J. Biol Chem., 2007, 282, 5101-5), и обычно включают одну или несколько последовательностей катионных аминокислот (лизины, аргинины).

Дополнительно объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой небольшую терапевтическую эффекторную молекулу класса противоопухолевых средств, такие как алкилирующие и подобные алкилирующим противоопухолевые средства, например, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, трофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, акилсульфонат, бусульфан, треосульфан, кармустин, ломустин, нимустин, эстрамустин, стрептозотоцином, прокарбазин, дакарбазин, темозоломид, тиотепа, дуокармицин и аналоги, центанамицин, адозелезин, бизелезин, карзелезинор, терапевтическая эффекторная молекула класса антиметаболитов, таких как пуриновые аналоги (6-тиогуанин, пентостатин, азатиоприн, 6-меркаптопурин, флударабин, кладрибин) или пиримидиновые аналоги (гемцитабин, 5-фторурацил) или антифолаты

(метотрексат), растительные алкалоиды и терпеноиды с антимитотической активностью, такие как алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин), дисоразолы и производные (дисоразол A1, A2, E1, Z), подофиллотоксин, такой как этопозид и тенипозид, таксаны (доцетаксел, паклитаксел), колхицины и их производные, майтансин и производные, включая аналоги с линкерами, гелданамицин и аналоги, такие как аминогексилгелданамицин или 17-аминогелданамицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как производные камптотецина – иринотекан и топотекан, амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид, противоопухолевые антибиотики, такие как дактиномицин, доксорубицин, даунорубицин. 2-пирролинодоксорубицин, эпирубицин, блеомицин, митомицин, пирролобензодиазепины (PBD), такие как антрамицин, мазетрамицин, томаимицин и аналоги, такие как димеры PBD, ингибиторы тирозинкиназы и ингибиторы мультикиназы, такие как стауроспорин, афатиниб, акситиниб, кабозантиниб, кризотиниб, дабрафениб, форетиниб, флуматиниб, иматиниб, понатиниб, регорафениб, ригосертиб, сорафениб, сунитиниб, тазоцитиниб, вандетаниб, вемурафениб, руксолитиниб, тасоцитиниб, траметиниб и аналоги этих агентов с функциональными группами для ковалентной конъюгации; другие синтетические или полусинтетические антимитотические агенты, такие как производные ауристатина, включая монометилауристатин E, монометилауристатин F и аналоги, производные доластатина, включая монометилуристатин N и аналоги, тубулизин и аналоги, калихеамицин и производные, включая калихеамицин 1 и N-ацетил- γ -калихеамицин DMH; ингибиторы РНК-полимеразы II, такие как циклический пептид – альфа-аманитин и аналоги.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы E- $[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, где E представляет собой терапевтическую эффекторную молекулу, где полипептидные эффекторные молекулы представляют собой антитела и фрагменты антител, которые конъюгированы с небольшой терапевтической эффекторной молекулой класса противоопухолевых средств.

В одном конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где полипептидные эффекторные молекулы, конъюгированные с небольшой терапевтической эффекторной молекулой класса противоопухолевых средств, выбраны из трастузумаба-DM1 (антитела, конъюгированного с майтансином), антител или их димеров, конъюгированных с монометил ауристатином E или F, антител, конъюгированных с калихеамицином.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой небольшую терапевтическую эффекторную молекулу класса фотосенсибилизаторов, например, тетрапирролы, порфирины, сапфирины, хлорины, тетрафенилпорфирины, тетрафенилхлорины, бактериохлорины, тетрафенилборат-бактериохлорины, феофорбиды, бактериофеофорбиды, пирофеофорбиды, бактериопирофеофорбиды, пурпуринимиды, бактериопурпуринимиды, бензопорфиринов, фталоцианины, нафталоцианины и их производные. Предпочтительно, фото сенсибилизатор выбран из группы, включающей феофорбид а, пирофеофорбид а, 3-ацетилфеофорбид а, 3-ацетилпирофеофорбид а, пурпурин-18-N-алкилимид, пурпурин-18-N-гидроксилимид, 3-ацетилпурпурин-18-N-алкилимид, 3-ацетилпурпурин-18-N-гидроксилимид, хлор е6, Sn-хлор е6, м-тетрагидроксифенилхлорин (м-THLC) и производное бензопорфирина, бензопорфирина производное монокислота (BPD-MA, вертепорфин).

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где G представляет собой соединяющую функциональную группу, образующую ковалентную связь между E и L.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где G выбран из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O-M⁺)O, P(=O)(O-M⁺)O, арилена, этенилена,

этинилена и триазолилена.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, где G образован посредством реакции конъюгации между реакционноспособной группой на линкере L и терапевтической эффекторной молекулой E. Реактивные группы включают COOH, активированные эфиры COOH, такие как N-гидроксисукцинимидиловый эфир, N-гидроксисульфосукцинимидиловый сложный эфир, п-нитрофениловый сложный эфир, пентафторфениловый эфир или сульфодихлорфениловый эфир; амина, гидразина, карбоксигидразина, изотиоцианата, изоцианата, малеимида, тетразина, винилсульфонового эфира, винилсульфонамида, бромацетил-, иодацетильную, бромацетиламид-, иодацетиламид-, карбальдегид-, тиол-, пиридилдисульфид-, тиацетил-, азидо-, пропаргил-, этинил-, аллил-, винил-, (дифтор)циклооктинил-, триарилфосфин-, бис(алкилокси)арилфосфин-, (глицил)глицилглицин-, гуанидин-. Предпочтительными являются связи следующих структур: $C(O)NH$, полученный из активированного сложного эфира на L (содержащий N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир, сульфо-N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир, п-нитрофениловый сложный эфир), $NHC(S)NH$, полученный из изотиоцианатной группы на L, -S-сукциниламид, полученный из малеимидогруппы на L, дисульфид -SS-, полученный из пиридилдисульфида или ацетилсульфида на L, триазол, полученный из терминальной пропаргильной группы или циклооктинильной группы на L, $-CH=N-$ (имин), полученный из альдегидной группы на L, $-CH_2-NH-$ (амин через имин путем восстановительного аминирования), полученный из альдегидной группы на L.

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где G для связывания содержит амидную связь $C(O)NH$, которая является частью пептидной цепи, полученной путем реакции ферментного сшивания.

Дополнительный объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, где противоион M^+ включает органические и неорганические катионы,

выбранные из лизина, меглума, TRIS, глицина или других аминов на основе аминокислот, или калий, натрий, литий или их смеси.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_m$, где m соответствует количеству в диапазоне 1-20, описывая, что вариант осуществления включает одну или несколько систем сульфатированного дендримера-1 с линкером $G-L-D(OSO_3^-M^+)_n$, связанных с терапевтической эффекторной молекулой E .

Дополнительно объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_m$, где n соответствует количеству сульфатных групп, выбранных из диапазона от 6 до 96.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, где n является четным числом, выбранным из 6, 8, 12, 16, 18, 24, 30, 32, 36, 40, 48, 72 или 96.

Для получения дендримера $D(OSO_3^-M^+)_n$ количество сульфатов также связано с его конечной молекулярной массой, обусловленной дендритной структурой и сульфатными группами, включая противоион. Было установлено, что, в конкретном варианте осуществления, плотность сульфатов должна быть на определенном уровне. Таким образом, молекулярная масса $D(OSO_3^-M^+)_n$ ограничена для каждого количества n в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения.

Предпочтительными являются дендримеры $D(OSO_3^-M^+)_n$ со следующими соотношениями между n и молекулярной массой, заданными для M^+ , представляющего ион щелочного металла, предпочтительно натрия.

Количество сульфатов (n)	Молекулярная масса $D(OSO_3^-M^+)_n$, не превышающая
6	2000 Да
8	2400 Да
12	4000 Да
16	5500 Да

18	6000 Да
24	8000 Да
30	10000 Да
32	11000 Да
36	12000 Да
40	13000 Да
48	16000 Да
72	24000 Да
96	32000 Да

В соответствии со способами синтеза для получения гидроксильированных дендритных структур (полиоловые структуры), предпочтительным является определенное количество сульфатных групп, выбранное из количества n , которое соответствует 6 или больше. Неожиданно было обнаружено, что высоко сульфатированный дендример, связанный с фрагментом антитела (50 кДа, меченый флуоресценцией в диапазоне Cy3 красителем ICC, см. пример 8), обеспечивает в 3 раза более высокое обнаружение в опухолевых клетках с сульфатами в количестве 24 или 32, по сравнению с аналогичным конъюгатом с сульфатами в количестве 12 или 16. Однако при использовании небольшой эффекторной молекулы E (1200 Да) наблюдается аналогичный эффект с дендримером, содержащим 12 и 18 сульфатных групп.

Соответственно, ввиду удобства в процессе синтеза, в одном из предпочтительных вариантов осуществления четное число n , равное 12, 16, 18, 24, 30, 32, 36, 40, 48, 72 или 96, является объектом по настоящему изобретению. Предпочтительно, n равно 12, 18, 24, 32, 36, 40 или 48. В случае, когда E обозначает белок с молекулярной массой выше 40 кДа, n предпочтительно равно 24, 32, 36, 40, 48 или больше. В случае, когда E обозначает соединение – малую молекулу или пептид с молекулярной массой, приблизительно, от 600 до 2000 дальтон, или белок с молекулярной массой от 1200 до 40000 дальтон, n предпочтительно составляет 12, 16, 24 или 32. В случае, когда m равно 2 или больше, n предпочтительно равно 6, 12, 16 или 24.

Дополнительный объект настоящему изобретению представляет

собой конъюгат общей формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$ для применения при лечении заболевания путем внутриклеточного захвата активированными клетками или пролиферативными клетками.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$ для применения при лечении заболевания, выбранного из группы, включающей злокачественную опухоль, воспаление, аутоиммунные заболевания, метаболические заболевания и фиброз, а также для антипролиферативного, пропролиферативного, антиапоптотического, проапоптотического, антифиброзного, профиброзного, антилипогенного, антидиабетического, иммуностимулирующего и противовозрастного лечения.

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при лечении и диагностике заболеваний обмена веществ, где указанные конъюгаты сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул направлены против молекулярных мишеней в клетках печени, таких как гепатоциты или звездчатых клеток печени.

В более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения в диагностике и лечении заболеваний обмена веществ, таких как диабет, алкогольная болезнь печени, вызванное приемом лекарственных средств или "токсичное" заболевание печени, жировая болезнь печени (стеатоз печени), неалкогольная жировая болезнь печени, стеатогепатит, вторичный цирроз, первичные билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, синдром Бадда-Киари, гемохроматоз, наследственный амилоидоз, синдром Жильбера.

В еще более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при лечении и диагностике вирусных заболеваний

печени, где указанные конъюгаты направлены против вирусных и невирусных молекулярных мишеней в клетках печени, таких как гепатоциты или звездчатые клетки печени.

В другом более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения в диагностике и лечении метаболических заболеваний, таких как гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, гепатит, вызванный вирусом Эпштейна-Барра, гепатит, вызванный вирусом цитомегалии, гепатит, вызванный вирусом простого герпеса, гепатит, вызванный вирусом краснухи, гепатит, вызванный вирусом эпидемического паротита, вирус краснухи, гепатит, вызванный аденовирусом, гепатит, вызванный желтой лихорадкой.

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат сульфатированных дендримеров и терапевтических молекул для применения в диагностике и лечении, где терапевтические молекулы, конъюгированные с сульфатированными дендримерами, могут быть выбраны из группы, включающей делебурир, ледипасвир, ламивудин, адефовир, дипивоксил, телевудин, тенафавир, рибаварин, теллапревир, боцепревир, симепревир, асунапревир, фалдапревир, софосбувир, даклатасвир, ванипревил, энтекавир, АВТ-333, АВТ-072, BMS-791325, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа, VX-950, VX-222, VX-985, ALS-2200, ALS-2158, SIRNA-034, МК-0608, R7227, R7128 (R05024048), RG7348, TMC435, TMC649128, PF-868554, PF-4878691, B1 201335, B1 207127, IC41, BMS-790052, BMS-791325, BMS-650032, BMS-824393, ANA598, VCH-759, GI 5005, ITX5061, ITX4520, IDX1 84, IDX320, IDX375, A-837093, GS 9190, GS 9256, ACH-1095, ACH-1625, ACH-2684, ACH-2928, PPI-461, PPI-1301, TG4040, AZD7295, MBL-HCV1, Clemizole, SPC3649, закрытая нуклеиновая кислота - ингибитор мРНК 122, GNI-103, GNI-104, GSK625433, АВТ-450, АВТ-072, INX-189, PS 1-938, EDP-239, SP-30, AVL- 181, AVL-192. ATI-0810, PRO 206, ITX2155, VX-500, VX-813, альбуферон альфа-2b - альбинтерферон, SCV-07, MX3235 Целгосивир, KPE02001003, KPE0000113, CTS-1027,

CB5300, Debio 025, MDX-1106 (ONO-4538), CYT107, CB-1 83872. RER 9C ингибиторы проникновения в клетку широкого спекта, AN 025-1, GEA007.1, IMMU 105.

Дополнительный объект настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$.

В одном конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, где указанная композиция имеет стандартную лекарственную форму, такую как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, где композиция представляет собой твердый препарат конъюгата в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$ вместе с известными фармацевтически приемлемыми носителями и/или вспомогательными веществами.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, где фармацевтическая лекарственная форма представляет собой лиофилизат.

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, где способ введения является парентеральным, включая подкожный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутритглазной, внутримышечный, внутриопухолевый.

В еще более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, где способ введения выбран из внутривенного, подкожного или внутрибрюшинного способа введения, включая множественные дозы соединений, включая ежесуточное введение, введение каждые 2-7 дней, введение более чем один раз в сутки, или с временными интервалами, например, введение в интервале пять дней.

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по

настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию для применения путем многократного введения, где многократное введение больным включает подкожную дозу, составляющую от 0,1 мг/кг до 1000 мг кг, предпочтительно от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, наиболее предпочтительно от 1 мг/кг до 1 мг/кг массы тела.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где количество m может отличаться в зависимости от природы молекулы E , используемой в соответствии с указанной формулой. Типичные варианты осуществления подробно описаны ниже в контексте их синтеза. Дополнительный объект по настоящему изобретению представляет собой применение белков в соответствии с общей формулой $-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где конъюгация D через линкер L со связывающей группой G осуществляется с аминокгруппами лизинов, что представляет собой процедуру статистической конъюгации, известную специалисту в данной области. Примеры 11-13 демонстрируют несколько возможностей. Конъюгация осуществляется статистически в зависимости от количества доступных функций аминокгрупп. Таким образом, молярное соотношение дендримерной системы $G-L-D(OSO_3^-M^+)_n$ к полипептиду описывается числом m , которое равно в среднем 1 или выше. Предпочтительным является среднее соотношение, составляющее от 1 до 5, более предпочтительно в диапазоне от 1 до 3 для статистической конъюгации, где каждый из дендримеров D имеет аналогичную молекулярную массу. Это означает, что каждый из сульфатированных дендримеров, конъюгированных с E , имеет одну и ту же молекулярную массу, однако конъюгат может состоять из смеси конъюгатов, имеющих каждый молярное соотношение, описываемое одним конкретным значением m , предпочтительно от 1 до 10. Это приводит к неоднородным смесям в зависимости от формы среднего числа. Это среднее число может быть аналитически определено специалистом в данной области техники, например, методом ВЭЖХ или посредством фотометрического анализа.

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по

настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, где E включает тиол, посредством чего они представляют собой тиоловые группы внутреннего цистеина, которые обычно доступны путем восстановления дисульфидных связей. Тиолы предпочтительно метятся малеимидом (например, дендримеры **d02**, **d03**, **d13**, **d14**, **d19**, **d20**), образуя тиозфир или пиридилдисульфид (например, дендримеры **d04**, **d05**, **d15**, **d21**), образуя дисульфид для G.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, в которой эффекторная молекула E на основе полипептидов или малых эффекторных молекул, может быть синтетически модифицирована для введения реакционноспособных функциональных групп, которые не присутствуют в исходном полипептиде, которые не доступны или вызывают потерю функциональности E, когда соответствующая функциональная группа ковалентно конъюгирована с сульфатированными дендримерами, например, тиольных групп внутреннего цистеина, которые были получены путем восстановления дисульфидных связей. Примерами реакций полипептидов с введением функциональных групп, каких как тиол или азид, являются взаимодействия с 2-иминотиоланом, ацетилтиопропионовой кислотой, азидоалкилкарбоновыми кислотами, азидо-ПЭГ-алкилкарбоновыми кислотами и другими соединениями, известными специалисту в данной области техники (Bioconjugate Techniques; Greg T. Hermanson; Academic Press, 2008).

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой применение полипептидов, которые получают биотехнологическим методом для переноса структур в определенных положениях в полипептидной последовательности, которые имеют функцию ковалентной, сайт-специфической конъюгации с полезной нагрузкой (Wang и др., передний Biosci. 2008, 13, 1716). Хорошо известными являются цистеиновые мотивы (цистеиновая метка, например, аминокислотная последовательность GGGCA или GGGCGGG), азидные функциональные группы для клик-реакции мечения, кодируемого путем замены

метионина на азидогомоаланин (Kiick et al., PNAS 2002, 99, 19-24), или мотивы для ферментативного сшивания, например, сортаза-опосредованное лигирование С-терминальной последовательности LPXTG с N-терминальным глициновым мотивом (Popp et al., Nature Chem Biol., 2007, 11, 707). Полипептиды доступны посредством известной технологии рекомбинантного получения или путем твердофазного пептидного синтеза. Таким образом, вариант осуществления включает также молярное соотношение m дендримерной системы $G-L-D(OSO_3^-M^+)_n$ и полипептида, соответствующее точно 1, вследствие сайт-направленной конъюгации, в отличие от статистической конъюгации, дающей средние значения m , как описано выше. Предпочтительной является конъюгация с тиольной группой цистеиновой метки с малеимидным образованием тиоэфира, или пиридилдисульфидным образованием дисульфида для G, а также сортаза-опосредованное ферментативное сшивание для последовательности LPXTGG (например, с дендримером d25), а также клик-реакция мечения азидов на основе азидогомоаланина.

В конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где эффекторная молекула E имеет более высокую молекулярную массу, чем конъюгированный сульфатированный дендример. Предпочтительный вариант осуществления включает конъюгаты, где E относится к полипептиду, который имеет до 20 раз более высокую молекулярную массу (Дальтон), связанную с суммой молекулярной массы, заданной значением n идентичных дендримерных единиц $[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, конъюгированных с полипептидом, более предпочтительно до 10 раз более высокую молекулярную массу, еще более предпочтителен до 5 раз более высокую молекулярную массу.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, где E представляет собой терапевтический полипептид класса ферментов, который удаляет незаменимые питательные вещества или факторы из цитозоля опухолевых клеток. Например, было неожиданно обнаружено, что

конъюгаты L-аспарагиназы с дендримером действуют в качестве сильного антипролиферативного средства во многих линиях опухолевых клеток. До сих пор специалисты в данной области не были способны доставлять терапевтическую макромолекулу L-аспарагиназы в цитозоль опухолевых клеток. Тем не менее, это свойство имеет важное значение, поскольку большинство опухолевых клеток может компенсировать недостаток захвата аспарагина посредством самостоятельного внутриклеточного синтеза. Также сюда включены конъюгаты дендримера с белком, нацеленные на опухолевый метаболизм. Предпочтительными являются белки-ферменты, например, терапевтические эффекторные молекулы, такие как гликозилазы, гидролазы, пируваткиназы, фумаратгидратазы, гексокиназы, альдолазы, энолазы, глюкозофосфатизомеразы.

В особенно предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m представляет собой конъюгат дендримерных систем с L-аспарагиназой, которая представляет собой гомотетрамер, каждый из четырех звеньев, обеспечивающих один дисульфидный мостик для восстановления и конъюгации без утраты ферментативной функции (Balan et al., Bioconjugate Chem. 2007, 18, 61), смотри пример 12a для синтеза и пример 15 и 16 для биологических данных.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению относится к применению белка A или белка G, который доступен в различных форматах, включая те, которые используют cys-метку. Например, дендримеры конъюгируются с рекомбинантным цистеиновым белком G (пример 12C), поддерживая аффинность связывания белка G к Fc-структуре в мышинном или человеческом IgG. Таким образом, объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где терапевтический эффектор представляет собой комплекс IgG-антитело - белок A или белок G, с ковалентной конъюгацией сульфатированного дендримера с белком A или G, используя вышеописанные способы конъюгации. Значение n предпочтительно равно 1, 2 или 3, используя один сульфатированный дендример на

белке А или G, и корректируя соотношение между IgG и дендримерным белком А/G путем нековалентной сборки в растворе.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой способ лечения заболевания, как описано выше, включающий применение конъюгатов сульфатированных дендримеров с терапевтическими эффекторными молекулами в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n)_m$, где терапевтический эффектор Е доставляется в цитозоль. Еще более предпочтительным является такой способ, где доставка в цитозоль осуществляется с линкерами L, которые являются стабильными, предотвращая тем самым высвобождение/расщепление терапевтического эффектора Е из сульфированного дендримера. Измерение высвобождения лекарственного средства из молекулы-носителя может быть осуществлено способами, известными специалисту в данной области, например, описанными Wakankar et al., MAbs 201 1, 3, 161 -172, включая способы ВЭЖХ или масс-спектропии, используемые для анализа конъюгатов лекарственных средств, инкубированных в сыворотке крови человека. В варианте осуществления изобретения, предпочтительным способом является описанное в настоящем документе применение при стабильности описанных дендримерных конъюгатов, обеспечивая содержание несвязанного лекарственного вещества предпочтительно не больше 10%, более предпочтительно 5% от конъюгированного количества (100%), измеренное после инкубации в течение 24 часов в сыворотке человека при 37°C методом ВЭЖХ.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой способ лечения заболевания, как описано выше, включающий применение конъюгатов сульфатированных дендримеров с терапевтическими эффекторными молекулами в соответствии с $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n)_m$, где терапевтический эффектор Е не применяется самостоятельно в качестве лекарственного средства без конъюгации вследствие концентраций в плазме и тканях на уровнях слишком токсичных для организма. Предпочтительно они представляют собой майтансин и

его аналоги, ауристатин и его аналоги, и стауроспорин и его аналоги. Конъюгаты сульфатированных дендримеров с указанными терапевтическими молекулами демонстрируют гораздо более низкую токсичность по отношению к непролиферирующим клеткам по сравнению с только лишь молекулами лекарственного вещества. В организме, при использовании нерасщепляемой линкерной структуры для L, которая стабильна в физиологических условиях в организме, в плазме обнаружены низкие концентрации несвязанного лекарственного вещества.

Другой аспект варианта осуществления относится к терапевтическим соединениям E в том, что касается их свойства демонстрировать лишь ограниченное проникновение в клетку без конъюгации с сульфатированным дендримером. Они, обычно, представляют собой белковые и полипептидные структуры, как описано выше, включая синтетические гидрофильные цитотоксические соединения. В примере 15 показано, что белок L-аспарагиназа не демонстрирует проникновение в опухолевые клетки, в то время как L-аспарагиназа, конъюгированная с сульфатированным дендримером, показывает значительно повышенную концентрацию внутри опухолевых клеток (таблица 5). Соответственно, при дендримерной конъюгации, клеточный захват усиливается. Таким образом, дополнительный объект настоящему изобретению представляет собой способ, при котором происходит 3-кратное, предпочтительно 5-ти кратное, наиболее предпочтительно, более чем 10-кратное усиление захвата в отношении количества конъюгированных молекул сульфатированных дендримеров с терапевтическими эффекторными молекулами в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, локализующимися внутри клетки (например, измеренный методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с использованием меченых красителем конъюгатов, смотри пример 15), по сравнению с неконъюгированными терапевтическими молекулами E.

В объеме настоящего изобретения соединения в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$ демонстрируют цитотоксическое действие на опухолевые клетки, а также описаны во вспомогательных примерах. Этот эффект может быть количественно

оценен посредством значения IC_{50} в М [моль/л], которое указано для нескольких примеров. Соответственно, объект по настоящему изобретению также относится к способу лечения заболевания, как описано выше, включающему применение конъюгатов сульфатированных дендримеров с терапевтическими эффекторными молекулами в соответствии с указанной формулой, демонстрируя значение IC_{50} в культуре опухолевых клеток меньше, чем 10^{-7} М, предпочтительно меньше, чем 10^{-8} М, более предпочтительно меньше, чем 10^{-9} М. Следует понимать, что эта величина может отличаться в зависимости от используемой клеточной линии и метода анализа (который может представлять собой определение клеточной пролиферации, анализируемой с помощью ММТ-теста или подсчета живых клеток относительно мертвых клеток).

В числе группы белков, которые действуют в качестве связывающих реагентов и обычно применяются для блокирования взаимодействия по типу белок-белок, сконструированные полипептидные каркасы имеют вполне определенное значение. Полипептидные каркасы представляют собой полипептиды, имеющие жесткую природную полипептидную структуру, которая может быть использована для изменения существующего или обеспечения нового участка связывания для молекулярной мишени. Обычно, такой каркас получают из устойчивого и небольшого растворимого мономерного полипептида (такого как ингибиторы Кунитца или липокалина) или из стабильно свернутого экстра-мембранного домена рецептора клеточной поверхности (например, белок А, фибронектин или анкириновый повтор). По сравнению с антителами или их рекомбинантными фрагментами, эти полипептидные каркасы часто обеспечивают практические преимущества, включая повышенную стабильность и высокий выход продукта в микробиологических экспрессирующих системах, вместе с независимой ситуацией интеллектуальной собственности. Поскольку для достижения высокой активности связывания с мишенями эти связывающие полипептиды получают посредством биомолекулярного технологического процесса, к ним также могут применяться дополнительные схемы отбора, ориентированные на другие желаемые свойства (такие как растворимость, термическая стабильность,

протеазная резистентность и т.д.). В течение последних 10-15 лет было предложено более 50 различных полипептидных каркасов. Самые современные подходы в этой области включают следующие полипептидные классы: (1) аффитела, производные Z-домена стафилококкового белка А, трехспиральный пучок из 58 остатков, обеспечивающих границу раздела на двух своих α -спиралях, (2) сконструированные домены Куниц-типа на основе небольшого (58 остатков каждый) и устойчивого ингибитора дисульфид-сшитой серин-протеазы, обычно, человеческого происхождения (например LACI-D1), которые могут быть разработаны для различных специфичностей протеаз, (3) монотела или аднектины, основанные на 10-м внеклеточном домене фибронектина человека типа III (10Fn3), который принимает иммуноглобулин-подобную бета-складчатую структуру (94 остатка) с 2-3 открытыми петлями, но отсутствует центральный дисульфидный мостик, (4) антикалины, полученные из липокалинов, многообразное семейство бета-баррель-белков с восьмью нитями (приблизительно 180 остатков), которые естественным образом образуют связывающие участки для небольших лигандов посредством четырех структурно варьируемых петель на открытом конце, которые в достаточной степени присутствуют у людей, насекомых и во многих других организмах, (5) дарпины, синтезированные домены с анкириновыми повторами (166 остатков), которые обеспечивают жесткую границу раздела вследствие обычно трех повторяющихся бета-витков и, наконец, несколько других связывающих белков на основе более специфических структур, такие как мультимеризованный LDLR-A модуль (авимеры или содержащие цистеин ноттин-пептиды).

Наряду со многими привлекательными свойствами сконструированных каркасов, они ограничиваются своей низкой молекулярной массой, что приводит к быстрому удалению после внутривенной инъекции. Дополнительным объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров и сконструированных полипептидов для внутриклеточной доставки сконструированных полипептидов для нарушения механизмов роста опухоли. В предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты сульфатированных дендримеров и

сконструированных полипептидов, где полипептидами являются конъюгаты дендримера с аффителом, конъюгаты дендримера с доменом Кунитца, конъюгаты дендримера с антикалином, конъюгаты дендримера с аффилином, конъюгаты дендримера с монотелом (аднектин), конъюгаты дендримера с дарпином и конъюгаты дендримера с пептидом. В особенно предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримера с сконструированными белками, которые обнаруживают высокую аффинность связывания с терапевтической мишенью в пикомолярном диапазоне и высокую стабильность, такими как дарпины.

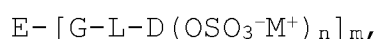
Специалисту в данной области известно, что полипептиды со сконструированным каркасом могут быть синтезированы и экспрессированы в виде димеров или мультимеров более 3-х полипептидных цепей для связывания с идентичным антигеном, а также подобными или другими антигенами. Таким образом может быть достигнуто увеличение времени полужизни в крови и увеличение силы связывания мишени. Конъюгаты дендримеров и димерных или множественных сконструированных полипептидов являются предметом изобретения и не описаны в литературе. Неожиданно было обнаружено, что конъюгаты дендримеров и сконструированный каркас, состоящий из 2-100 повторяющихся полипептидных цепей, обладают гораздо более высокой рост-ингибирующей активностью, чем конъюгаты дендримера и одного сконструированного полипептида. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров и 2-20 повторяющихся полипептидных цепочек, в конкретном предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров и 2-10 повторяющихся полипептидов. В другом варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров и нескольких повторяющихся полипептидов, где полипептиды связываются посредством расщепляемых линкерных молекул, таких как последовательности ферментативно расщепляемых аминокислот.

Другой аспект настоящего изобретения относится к

ингибированию молекулярного связывания L-селектина, что может быть определено, как описано Darnedde et al. in PNAS, 2010, 107, 19679-84. При этом полимерный неопределенный полиглицеринсульфат ($M_n \sim 10$ кДа) демонстрирует высокую способностью ингибирования связывания L-селектина при IC_{50} 8 нМ, например, при использовании полимера с 61 сульфатной группой в среднем. В случае определенного сульфатированного дендримера в соответствии с изобретением, соизмеримо содержащего 48 сульфатных групп, значения (~ 300 нМ) являются неожиданно более высокими, указывая на гораздо более слабое ингибирование связывания L-селектина. Таким образом, объектом настоящего изобретения является обеспечение соединений в соответствии с формулой $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)_n]_m$, которые демонстрируют значения IC_{50} ингибирования связывания L-селектина >30 нМ, предпочтительно >100 нМ, более предпочтительно >300 нМ, наиболее предпочтительно >500 нМ, измеренные в соответствии с PNAS, 2010, 107, 19679-84.

Другие предпочтительные варианты осуществления изобретения отражены в приведенных ниже последовательно пронумерованных предложениях:

1. Конъюгат формулы



где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу,

где $D(OSO_3^-M^+)_n$ представляет собой дендример D, содержащий сульфатные группы $OSO_3^-M^+$ в количестве n, где количество n сульфатных групп выбрано из диапазона от 6 до 96,

где M представляет собой катионный неорганический или органический противоион к анионной сульфатной группе, где L представляет собой линкер или спейсер между D и E,

где G представляет собой связывающую функциональную группу, образующую соединение между L и E, и где m представляет собой целое число от 1 до 20.

2. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1, где каждый из дендримеров D указанного конъюгата имеет аналогичную молекулярную массу.

3. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где количество сульфатных групп n является одинаковым для каждого дендримера D.

4. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-3, где повторяющиеся звенья мономеров для построения дендримера D выбраны из группы, состоящей из 1,2-замещенного глицерина, 1,3-замещенного глицерина, пентаэритрита, глюкозы, маннозы, галактозы, лизина, трис (гидроксиметил) аминметана, трис (пропионовая кислота) аминметана, 1,1'-бис (гидроксиметил) - пропионовой кислоты, янтарной кислоты, глутаровой кислоты, малеиновой кислоты, гликолевой кислоты, дигликолевой кислоты, адипиновой кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, (2-аминоэтил) амида пропионовой кислоты, пропиленмин, этиленмин, пропиленоксид и этиленоксид.

5. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-4, где связь указанных мономеров в дендримере D основана на функциональных группах, выбранных из простого эфира, тиоэфира, эфира карбоновой кислоты, эфира сульфониловой кислоты, сульфонида, карбоксиламида, амина, карбамата, тиокарбамата, мочевины, тиомочевины, гидразона, имина, дисульфида, фосфата, фосфоната, триазола, ацетала и кетала.

6. Конъюгат в соответствии с вариантами осуществления 1-5, где D содержит концевые группы, выбранные из 1,2-дисульфатоалкила, 1,3-дисульфатоалкила, 1,2,4-трисульфато-3-алкила, N,N'-ди (1-сульфатоалкил) амина, трис (сульфатометил) метила и 1,2,3,4,5-пентасульфатоалкила.

7. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1, где L представляет собой C_{4-100} -алкильную группу, выбранную из группы, состоящей из алифатических циклических, разветвленных или линейных звеньев, в которых одна или несколько метиленовых групп могут независимо быть заменены звеном, выбранным из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O-M⁺)O, P(=O)(O-M⁺)O, арилена, этенилена или этинилена, и триазилилена, в котором любой атом водорода может быть независимо заменен

метилом, этилом или гидроксиметилом.

8. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1, где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу.

9. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 8, где эффекторные молекулы выбраны из группы, состоящей из малых молекул, пептидов, белков, гликанов и нуклеиновых кислот.

10. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 8 или 9, где эффекторная молекула представляет собой терапевтическую эффекторную молекулу, содержащую вещества, которые могут нарушать внутриклеточные механизмы пролиферации, апоптоза, синтеза вещества соединительной ткани (например, коллагена, фибронектина), иммунитета, физиологического старения или иммунной защиты.

11. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 9, где малая молекула выбрана из группы, состоящей из цитостатиков и пептидных или пептидомиметических структур, включая циклические или с открытой цепью пептиды с природными или неприродными структурными модификациями.

12. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 9, где белки выбраны из группы, состоящей из глобулярных белков, гликопротеинов, токсинов, ферментов, антител, фрагментов антител, сконструированного антитела и белковых конструкций, включая однодоменные антитела (sdAb), одноцепочечные антитела на основе переменных фрагментов (scFv), антитела, содержащие одноцепочечный переменный и константный фрагменты (ScFv-Fc).

13. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 8-12, где E направлен против молекул, участвующих в пролиферации и апоптозе опухолевых клеток.

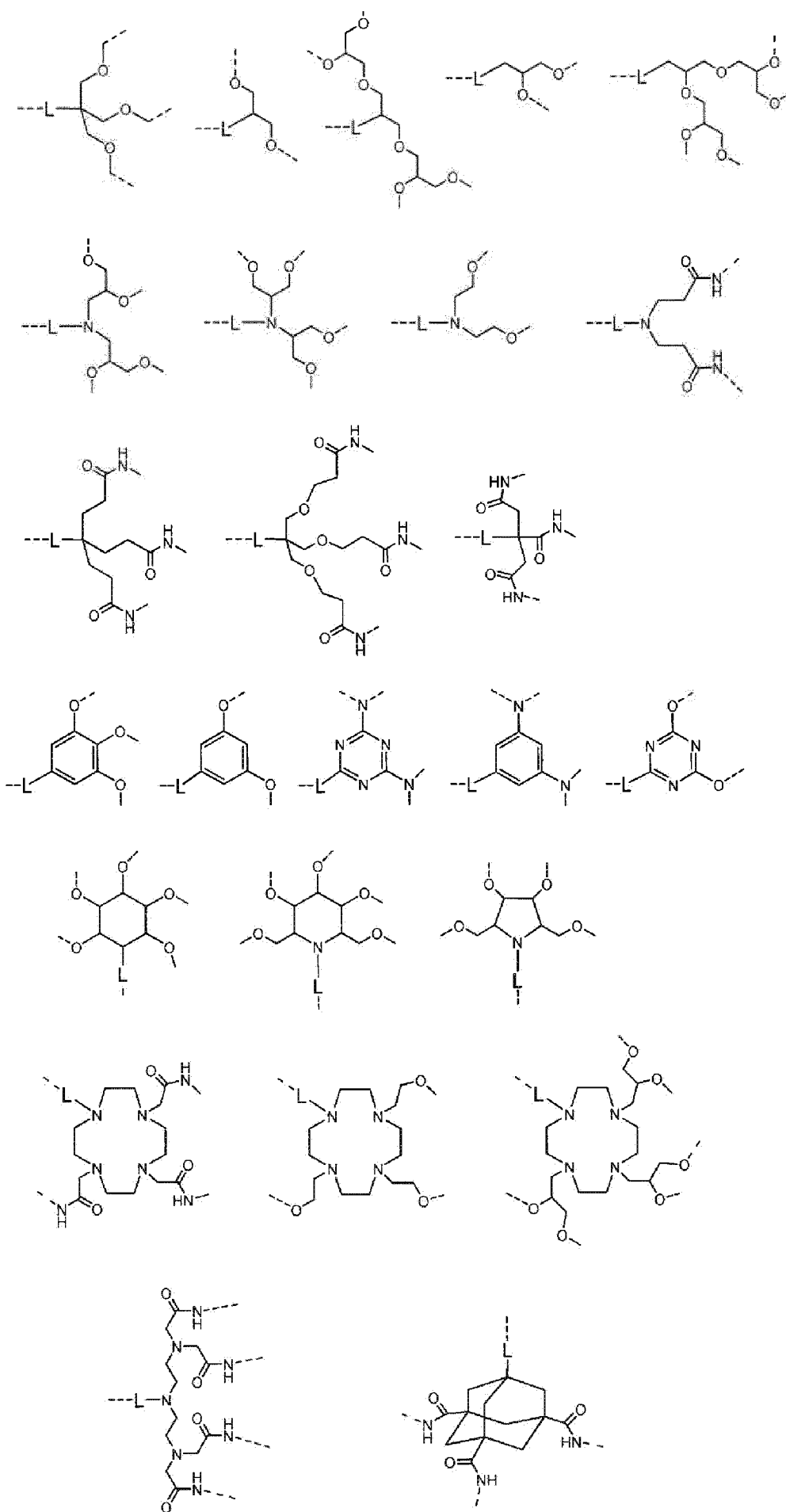
14. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1, где G представляет собой связывающую функциональную группу, образующую ковалентное присоединение между E и L, выбранную из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(-NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O-M⁺)O, P(=O)(O-M⁺)O, арилена, этенилена, этинилена и триазилилена.

15. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-14 для применения (I) при лечении заболевания, выбранного из группы, включающей злокачественную опухоль, воспаление, аутоиммунное заболевание, метаболическое заболевание и фиброз, или (II) в антипролиферативном, пропролиферативном, антиапоптотическом, проапоптотическом, антифиброзном, профиброзном, антилипогенном, антидиабетическом, иммуностимулирующем и замедляющем старение лечении.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-15.

17. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 1, где m равно 1.

18. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-15, где указанный дендример D содержит звено центрального дендримерного ядра (CDCU), выбранное из группы



19. Конъюгат в соответствии с вариантом осуществления 4, где указанный дендример D имеет структуру, состоящую из указанного звена центрального дендримерного ядра (CDCU) и m оболочек повторяющихся звеньев мономеров RU_x , с x , изменяющимся от 1 до p , где в каждой оболочке повторяющиеся звенья идентичны, и где повторяющиеся звенья для оболочек RU_1 – RU_p независимо выбраны из 1,2-замещенного глицерина, 1,3-замещенного глицерина, пентаэритритола, глюкозы, маннозы, галактозы, лизина, трис (гидроксиметил) аминметана, три (пропионовая кислота) аминметана, 1,1'-бис (гидроксиметил) – пропионовой кислоты, янтарной кислоты, глутаровой кислоты, малеиновой кислоты, гликолиевой кислоты, дигликолевой кислоты, адипиновой кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, (2-аминоэтил) амида пропионовой кислоты, пропиленimina, этиленimina, пропиленоксида, этиленоксида, в частности, 1,2-замещенного глицерина, 1,3-замещенного глицерин пропиленоксида и этиленоксида, и где количество повторяющихся звеньев на оболочку x идентично количеству свободных функциональных групп в оболочке $(x-1)$, и где все свободные функциональные группы оболочки RU_p являются сульфатированными.

20. Конъюгат варианта осуществления 19, где повторяющиеся звенья RU_p одинаковы во всех оболочках.

21. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1–15, где E направлен против целевой молекулы, локализованной внутри клетки-мишени, предпочтительно в пределах цитозоля клеток-мишеней, в частности, где указанные клетки-мишени представляет собой опухолевые клетки.

22. Конъюгат варианта осуществления 21, где указанная целевая молекула выбрана из Fox01, HDAC, DP-1, E2F, ABL, AMPK, BRK, BRSK1, BRSK2, BTK, CAMKK1, CAMKK альфа, CAMKK бета, Rb, Suv39H1, SCF, p19INK4D, GSK-3, p18INK4, мус, циклин E, CDK2, CDK9, CDG4/6, циклин D, p16 INK4A, cdc25A, BMI1, SCF, Akt, CHK1/2, CK1 дельта, CK1 гамма, CK2, CLK2, CSK, DDR2, DYRK 1A/2/3, EF2K, EPH-A2/A4/B1/B2/B3/B4, EIF2AK3, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, p53, p21 Cip1, PAX, Fyn, CAS, C3G, SOS, Tal, Raptor, RACK-1, CRK, Rap1, Rac, KRas, NRas, HRas, GRB2, FAK,

PI3K, spread, Spry, mTOR, MPK, LKB1, PA 1/2/4/5/6, PDGFRA, PYK2, Src, SRPK1, PLC, PKC, c-Raf, PKA, PKB альфа/бета, PKC альфа/гамма/зета, PKD, PLK1, PRAK, PRK2, RIPK2, B-Raf, WAVE-2, TSC2, DAPK1, BAD, IMP, C-TAK1, TAK1, TAO1, TBK1, TESK1, TGFB1, TIE2, TLK1, TrkA, TSSK1, TTBK1/2, TTK, Tpl2/cot1, MEK1, MEK2, PLD1, Erk1, Erk2, Erk5, Erk8, p90RSK, PEA-15, SRF, p27 KIP1, TIF 1a, HMG1, ER81, MKP-3, c-Fos, FGF-R1, GSK3 бета, HER4, HIPK 1/2/3/, IGF-1R, cdc25, UBF, LAMTOR2, Stat1, Stat3, CREB, JAK, Src, PTEN, NF-каппаВ, 11ECTH9, Bax, HSP70, HSP90, Apaf-1, Cyto c, BCL-2, Bcl-xL, Smac, XIAP, Каспаза-9, Каспаза-3, Каспаза-6, Каспаза-7, CDC37, TAB, IKK, TRADD, TRAF2, RIP1, FLIP, TAK1, JNK 1/2/3, Lck, A-Raf, B-Raf, C-Raf, MOS, MLK1/3, MNK1/2, MSK1, MST2/3/4, MPSK1, MEK1, MEK4, MELK, ASK1, MINK1, MKK1/2/3/4/6/7, NEK2a/6/7, NUA1, OSR1, SAPK, STK33, Syk, Lyn, PDK1, PHK, PIM1/2/3, Атаксин-1, mTORC1, MDM2, p21 Waf1, Циклин D1, Ламин А, Tpl2, Мус, катенин, Wnt, IKK-бета, IKK-гамма, IKK-альфа, IK-эпсилон, ELK, p65RelA, IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRR, FADD, TRAF6, TRAF3, MKK3, MKK6, ROCK2, RSK1/2, SGK1, SmMLCK, SIK2/3, ULK1/2, VEGFR1, WNK1, YES1, ZAP70, MAP4K3, MAP4K5, MAPK1b, MAPKAP-K2/K3, p38 альфа/бета/дельта/гамма MAPK, Aurora A, Aurora B, Aurora C, MCAK, Clip, MAPKAPK, FAK, MARK1/2/3/4, Muc1, SHC, CXCR4, Gap

Определения

В химии конъюгат относится к соединению, образуемому соединением двух или более химических соединений. Используемый в описании настоящего изобретения и в формуле изобретения термин "конъюгат", в частности, имеет значение связанной группы соединений, имеющих элементы формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$, в частности, эффекторная молекула E, связующая функциональная группа G, линкер L, дендример D и n сульфатные группы $(OSO_3^-M^+)$, где M представляет собой катионный неорганический или органический противоион, где n представляет собой целое число от 1 до 20.

Термин "дендример" D, используемый в настоящем документе, в большинстве случаев обозначает разветвленные молекулы, где дендример обычно имеет симметричную структуру, окружающую ядро,

и часто принимает сферическую трехмерную форму. Дендритные молекулы характеризуются структурным совершенством. Дендримеры являются монодисперсными и, обычно, высоко симметричными сферическими соединениями. Дендритные молекулы можно условно разделить на низкомолекулярные и высокомолекулярные виды. Первый вид соединений включает дендримеры и дендроны, а последний включает дендронизированные полимеры, гиперразветвленные полимеры и полимерную щетку.

Свойства дендримеров зависят от функциональных групп на поверхности молекулы, тем не менее, существуют примеры дендримеров с внутренними функциональными группами. Дендритная инкапсуляция функциональных молекул позволяет выделять активные участки, структуру, которая имитирует активные участки в биологических веществах. Кроме того, можно получить растворимые в воде дендримеры, в отличие от большинства полимеров, путем функционализации их внешней оболочки заряженными частицами или другими группами. Другие регулируемые свойства дендримеров включают токсичность, степень кристаллизации, образование тecto-дендример и хиральность.

D представляет собой дендример или дендритную структуру, которая структурно определяется относительно его молекулярной массы, соответствующая химической структуре с одной молекулярной массой.

$D(OSO_3^-M^+)_n$ означает, что дендример D является высоко сульфатированным, имея количество n сульфатных групп $(OSO_3^-M^+)$. Сульфатные группы предпочтительно получают из гидроксильных групп, которые преобразуют в сульфатные группы (моноэфиры сульфоновой кислоты) посредством процесса сульфатирования (смотри также примеры). Соответственно, дендримеры содержат определенное количество сульфатных групп, полученных из групп OH. Эти группы OH предпочтительно расположены на поверхности или внешней оболочке дендримера и являются частью структурных элементов, используемых для образования структуры дендритных полиолов.

Дендример D состоит из повторяющихся звеньев мономеров для построения дендритной структуры, содержащей структуры, такие

как 1,2-замещенный глицерин, 1,3-замещенный глицерин, пентаэритритол, лизин, трис (гидроксиметил) аминометан. Кроме того, структуры, содержащие алкил-карбоновую кислоту или алкил-бискарбоновую кислоту, например, трис (пропионовая кислота) аминометан, 1,1'-бис (гидроксиметил) пропионовую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, малеиновую кислоту, гликолевую кислоту, дигликолевую кислоту, адипиновую кислоту, молочную кислоту, лимонную кислоту, (2-аминоэтил) амид пропионовой кислоты, а также алкиламино структуры, такие как пропиленмин, этиленмин и аминокислотные структурные элементы, являются частью варианта осуществления. Кроме того, моносахаридные структуры, такие как глюкоза, манноза, галактоза являются возможными повторяющимися звеньями в дендримерах. Типичные, но не ограничивающие, примеры показаны на фигурах 1-7. Предпочтительные дендримеры содержат 1,2-замещенный глицерин и/или 1,3-замещенный глицерин. Более предпочтительные дендримеры содержат 1,2-замещенный глицерин и/или 1,3-замещенный глицерин, необязательно в сочетании со звеньями алкилкарбоновой кислоты, обеспечивая, предпочтительно, связи, выбранные из функциональных групп сложного эфира, простого эфира и амида.

Синтез дендримеров известен специалистам в данной области техники. Общая структура дендримера может быть построена посредством конвергентного синтеза или дивергентного синтеза (Tomalia, WO2006/1 15547; Medina et al., Chem. Rev. 2009, 109, 3141; Crespo et al., Chem. Rev. 2005, 105, 1663). Предпочтительный вариант осуществления синтеза представляет собой способ синтеза, где звено ядра (как описано выше) модифицируется таким образом, чтобы линкерное звено или функциональная группа зафиксировалась для дополнительного расширения посредством дополнительного линкерного звена. Затем дендример конструируется путем дивергентного добавления дополнительных оболочек, начиная со звена ядра. Таким образом, линкер, присоединенный к звену ядра, находится в центральном положении в качестве сердцевины. Сочетание посредством конвергентного синтеза может осуществляться с последующим

добавлением дополнительного дендримерного звена, которое предварительно было построено либо дивергентным, либо конвергентным способами, к звену ядра или оболочкам, создавая, таким образом, дополнительную оболочку. Кроме того, конвергентно синтезированный дендример с фокальным присоединением линкера может затем быть дополнительно модифицирован путем дивергентного добавления дополнительных оболочек. Вариант осуществления дополняется примерами синтеза (1-11).

Связь мономеров в дендримере основывается на функциональных группах, выбранных из простого эфира, тиоэфира, эфира карбоновой кислоты, эфира сульфониловой кислоты, сульфонида, карбоксиламида, амина, карбамата, тиокарбамата, мочевины, тиомочевины, гидразина, имида, дисульфида, фосфата, фосфоната, триазола. Соответственно дендример состоит из повторяющихся субъединиц или оболочек, основанных на различных мономерных звеньях, включая, но ими не ограничиваясь, примеры, описанные в настоящем документе (рисунки 1-7). Предпочтительные дендримеры содержат 1,2-замещенный глицерин и/или 1,3-замещенный глицерин, необязательно в сочетании со звеньями алкилкарбоновой кислоты, обеспечивая, предпочтительно, связи, выбранные из эфирных функциональных групп, простого эфира и амида.

В вариантах осуществления используется термин дендример, который обычно обозначает древовидную разветвленную структуру. Термин дендрон обычно описывает дендример с одной химически адресуемой группой, называемой сердцевинной, но эти термины обычно используются как взаимозаменяемые.

Дендример D сконструирован таким образом, что линкерное звено L ковалентно присоединено к нему. Предпочтительными являются структуры, в которых линкерное звено L ковалентно связано с центром дендримера, который также называется сердцевинной. Из этой сердцевины выращивается дендример с образованием своей дендритной структуры. Типичные, но не ограничивающие объем настоящего изобретения, примеры изображены на фигурах 1-7, где "звезда" иллюстрирует связь линкера L с

сердцевиной дендримера.

"Линкер" или "спейсер" в соответствии с настоящим изобретением обозначает химическую структуру, которая сшивает две химические молекулы, путем формирования одной ковалентной связи с первой молекулой и другой ковалентной связи со второй молекулой. Линкер, обычно, включает две реакционноспособные группы, которые могут быть идентичными (гомобифункциональный линкер) или разными (гетеробифункциональный линкер). В контексте настоящего изобретения, сульфатированным дендримером D является первая молекула, а линкер образует ковалентную связь с сердцевиной в дендримере. Терапевтической эффекторной молекулой E является вторая молекула с ковалентной связью, образованной структурой G. Часто подобным образом используется термин "спейсер", больше с целью указания, что в указанной структуре образуется определенное расстояние ("пространство") между двумя сшитыми молекулами.

В соответствии с настоящим изобретением, "конъюгат" представляет собой молекулу, которая состоит двух или более различных типов молекул, которые ковалентно связаны друг с другом с помощью линкера или спейсера, образуя, таким образом, конъюгат.

Термин "концевая группа" в контексте химической структуры дендримера D описывает мономерные звенья внешней оболочки, которая является мономером, к которому не присоединено дополнительное звено мономера. Большинство химических свойств молекулы зависит от типов концевых групп. Физические свойства молекул, такие как растворимость и вязкость, также зависят от концевых групп. Соответственно, концевые группы в пределах объема настоящего изобретения обеспечивают сульфатные группы, полученные из гидроксильных групп. Эти сульфатные группы определяют биологические свойства конъюгатов дендримеров по изобретению с эффекторными молекулами, как описано выше.

Противоион M^+ включает органические и неорганические катионы. Органические катионы включают лизин, меглумин, TRIS, глицин или другие амины, производные аминокислот. Неорганические катионы включают калий, натрий, литий или их

смеси. Предпочтительным является натрий, дающий группы $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$.

Термин "антитело" хорошо известен в данной области техники. Как используется в настоящем описании, он обозначает иммуноглобулин или любой его функциональный фрагмент. Он охватывает любой полипептид, который имеет участок связывания антигена. Он включает, но ими не ограничивается, моноклональные, поликлональные, моноспецифические, полиспецифические, неспецифические, гуманизированные, человеческие, одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутантные, привитые и *in vitro* выработанные антитела. Термин "антитело" включает фрагменты антител, а также, например, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, и любые другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию. Обычно такие фрагменты будут содержать антиген-связывающий домен. Термин "антитело", как определено выше, предпочтительно, характеризуется константой связывания, составляющей, по меньшей мере, 10^7 – 10^{10} М в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, "антитело" представляет собой белок, который продуцируется в результате реакции на антигенный стимул, и специфически распознает и связывает антиген, продуцирующий стимул.

Используемый в настоящем описании термин "миметики антител" представляют собой органические соединения, которые, подобно антителам, могут специфически связывать антигены, но которые структурно не связаны с антителами. Они представляют собой, обычно, искусственные пептиды или белки с молекулярной массой приблизительно от 3 до 20 кДа. Нуклеиновые кислоты и малые молекулы иногда считаются миметиками антител, а также, но не искусственные антитела, фрагменты антител и рекомбинантный белок, состоящие из них. Некоторые типы имеют подобную антителу бета-складчатую структуру. Общими преимуществами, по сравнению с антителами, являются лучшая растворимость, проникновение в ткани, устойчивость по отношению к нагреву и ферментам, а также сравнительно низкие производственные затраты. Миметики антител разрабатываются в качестве терапевтических и диагностических средств. Термин "каркасы", используемый выше, охватывается

термином "миметики антител". Используемый в настоящем описании термин "эффектор" относится к эффекторной молекуле, которая может выступать в качестве терапевтической или диагностической эффекторной молекулы. Терапевтическая эффекторная молекула обычно представляет собой молекулу, которая селективно связывается с белком и регулирует его биологическую активность. Таким образом, терапевтические эффекторные молекулы действуют в качестве лигандов, которые могут повышать или понижать активность ферментов, экспрессию генов или клеточную сигнализацию. Эффекторные молекулы также могут непосредственно регулировать активность некоторых молекул мРНК (рибопереключатель). В контексте настоящего изобретения, полипептиды, включая белки и антитела, описанные выше, рассматриваются как функционирующие в качестве терапевтических эффекторных молекул, в частности в клеточных каскадах сигнальной трансдукции.

Термин "диагностическая эффекторная молекула" относится к молекулам, которые при указанных выше биологических взаимодействиях обеспечивают обнаруживаемый или регистрируемый сигнал, допускающий количественную оценку или мониторинг присутствия этой молекулы в клетке-мишени. Этот сигнал может быть измерен аналитическими, химическими или физическими методами, такими как иммуно-ферментный анализ ELISA, иммунологические анализы, диагностическая визуализация, включая обнаружение флуоресценции, радиоактивное излучение или магнитную релаксацию. В частности, эффекторные молекулы могут быть мечены различными молекулами, выбранными из флуоресцентных красителей, радиоактивных изотопов, парамагнитных металлов.

Термин "транспортный белок" охватывает различные термины, включая трансмембранный насос, транспортный белок, сопровождающий белок, транспортный белок для переноса кислот, транспортный белок для переноса катионов или транспортный белок для переноса анионов. Соответственно, он представляет собой белок, который переносит другие вещества в организме.

В зависимости от своей функции, известны различные виды

транспортных белков. К ним относятся белки-носители, участвующие в движении ионов, малых молекул или макромолекул, таких как другой белок или вирус, через биологическую мембрану. Белки-носители представляют собой мембранные белки, подразумевая, что они находятся в пределах мембраны, через которую они переносят вещества. Они также называются трансмембранными белками переноса растворенных веществ, способствуя пассивному или активному переносу, также называемому опосредованным переносчиками переносом.

Описание фигур

На **фигуре 1** представлены примеры химических структур сульфатированных дендримеров в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 1A**: ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 24 сульфатные группы,

На **фигуре 1B**: ядро на основе, например, глицерина или 2-амино-пропан-1,3-диола, дендримерные звенья: глицерин, 1,3-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 32 сульфатные группы (сульфатная группа, представленная как S в окружности, звезда указывает на связь с линкером L).

На **фигуре 2** представлены примеры химических структур сульфатированных дендримеров в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 2A**: ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: пентаэритритол и глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 36 сульфатные группы,

На **фигуре 2B**: ядро на основе 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты, дендримерные звенья: 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовая кислота, связанная как сложный эфир, и глицерин, 1,2-замещенный, связанная как простой эфир (-O-), 32 сульфатные группы.

На **фигуре 3** представлены приведенные в качестве примера химические структуры сульфатированных дендримеров в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 3А:** ядро на основе, например, аминотетрагидрохис (пропионовая кислота) или гидроксиметил-трис (пропионовая кислоты, связанной как амид, дендримерные звенья: глицерин, 1,2-замещенный, и глицерин 1,3-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 24 сульфатные группы,

На **фигуре 3В:** ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: пропионовая кислота, связанная как амид, глицерин, 1,3-замещенный, и глицерин, 1,3-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 24 сульфатные группы.

На **фигуре 4** представлены приведенные в качестве примера химические структуры сульфатированных дендримеров в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 4А:** ядро на основе, например, трис (пропионовая кислота) метиламина, дендримерные звенья: пентаэритритол, связь в виде сложного эфира, глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир, 36 сульфатные группы,

На **фигуре 4В:** ядро на основе, например, трис (пропионовая кислота) метиламина, дендримерные звенья: бис (пропионовая кислота) этилен диамин, связь в виде амида, триглицеринамин, связанный как амид, 32 сульфатные группы.

На **фигуре 5** представлены приведенные в качестве примера химические структуры сульфатированных дендримеров в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 5А:** ядро на основе, например, глицерина или 2-амино-пропан-1,3-диола, дендримерные звенья: глицерин, 1,3-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), янтарная кислота, связанная как сложный эфир, 32 сульфатные группы,

На **фигуре 5В:** ядро на основе, например, трис (пропионовая кислота) метиламина, дендримерные звенья: глицерин, 1,3-замещенный, янтарная кислота; 24 сульфатные группы.

На **фигуре 6** представлены приведенные в качестве примера химические структуры сульфатированных дендримеров на основе фрагментов сахара в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 6А:** ядро на основе монофункционализированного циклодекстрина (здесь β -циклодекстрин): дендримерные звенья:

глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-O-), 40 сульфатных групп,

На **фигуре 6B**: ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: пропионовая кислота, связанная как амид, бис(глюкамин), связанный как амид, 30 сульфатных групп.

На **фигуре 7** представлена химическая структура сульфатированного дендримера, приведенная в качестве примера: ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS; этиленоксидные звенья, связанные посредством эфирной связи с пентаэритритолом; дендримерные звенья на пентаэритритоле: глицерин, 1,2-замещенный, связанный посредством простого эфира; 36 сульфатные группы в соответствии с настоящим изобретением

На **фигуре 8** показан клеточный захват конъюгатов дендримеров (пример 15) в соответствии с настоящим изобретением.

На **фигуре 8A** показано микроскопическое изображение клеток SKBR3, демонстрирующих флуоресценцию ICC-d02 в виде однородного распределения, позволяющего визуализировать тело клетки.

На **фигуре 8B** показан спектр поглощения клеточного лизата SKBR3 после инкубации с ICC-d02, дающий 5 млн молекул/клетку, извлеченных из внутриклеточного компартмента.

Примеры

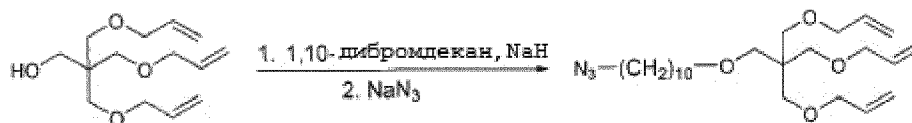
Следующие примеры можно повторить с аналогичным положительным результатом путем замены конкретно или описанных с генетической точки зрения реагентов и/или режимов технологического процесса по настоящему изобретению. Полагают, чем любой специалист в данной области может легко определить основные характеристики по настоящему изобретению и воспринимает примеры изобретения как иллюстративные. Таким образом, приведенные ниже примеры не ограничивают объект настоящего изобретения.

Пример 1:

Синтез полиглицериновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и аминотерминальным линкером (соединение d01).

Пример 1a:

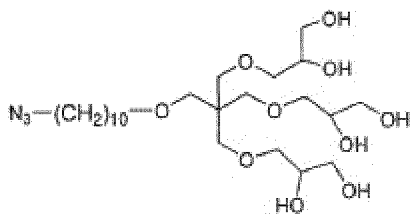
Синтез 10-азидодецил-триаллилпентаэритритола



К раствору триаллилпентаэритритола (5 г, 19,5 ммоль) в 50 мл сухого ТГФ добавляли частями твердый NaH (3,9 г, 98 ммоль, 60% дисперсия в минеральном масле). Смесь перемешивали при 40°C в течение 3 ч, с последующим добавлением 0,3 г йодида калия и раствора 1,10-дибромдекана (29,3 г, 98 ммоль) в 20 мл ТГФ. Через 24 ч при нагревании с обратным холодильником смесь обрабатывали водой, упаривали досуха и остаток растворяли в смеси вода/дихлорметан. Продукт экстрагировали в дихлорметане, сушили над Na_2SO_4 и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (циклогексан/этилацетат) с выходом 8,1 г промежуточного соединения 10-бромдецил-триаллилпентаэритритола. 8 г (16,8 ммоль) промежуточного продукта растворяли в ДМФ (50 мл) и добавляли азид натрия (5,6 г, 84 ммоль). Смесь перемешивали при 80°C в течение 24 ч с последующим фильтрованием и упариванием растворителя. Хроматографическая очистка (циклогексан, затем дихлорметан:метанол 95:5-1:1) давала 4,0 г (55%) продукта в виде светло-желтого масла.

Пример 1b:

Синтез 10-азидодецил-трис(2,3-дигидроксипропил) пентаэритритола



Взаимодействие осуществляли в соответствии с Zieringer et al., ChemPhysChem, 2010, 1, 2617. В 300 мл смеси трет-бутанол/вода (1:1) растворяли 10-азидодецил-триаллилпентаэритритол (4,0 г, 9,1 ммоль). К указанной смеси добавляли триметиламин-N-оксид дигидрат (9,1 г, 82,4 ммоль), лимонную кислоту (10,0 г, 47,7 ммоль) и калия осмат дигидрат

(0,4 г, 1,1 ммоль), с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 24 часов. Добавляли ионообменную смолу Lewatit K6267 (70 г) и смесь оставляли перемешиваться в течение еще 1 часа. После фильтрования и промывки смесью трет-бутанол/вода 1:1, раствор упаривали досуха, и остаток очищали хроматографией (RP C-18 Licroprep), используя смесь вода/метанол в ЖХСД системе. Выход продукта составлял 3,5 г (71%) в виде бесцветного вязкого масла.

Пример 1с:

Синтез дендримера из 10-азидодецил-трис(2,3-дигидроксипропил)пентаэритрита

Дендример получали известными способами из дендрона, состоящего из глицериновых мономеров (1,2-замещенная структура), с использованием 24 гидроксигрупп (Zieringer et al., Chem. Phys. Chem. 2010, 11, 2617 и Wyszogrodzka et al., Eur. J. Org. Chem. 2008, 53) в течение 4 реакционных стадий чередующегося аллилирования со смесью NaH/аллилбромид и дигидроксилирования. Продукт представлял собой 10-азидодецил-глицерин (OH_{24}) с молекулярной массой 1873 г/моль, который сульфатировали на следующей стадии.

Пример 1d:

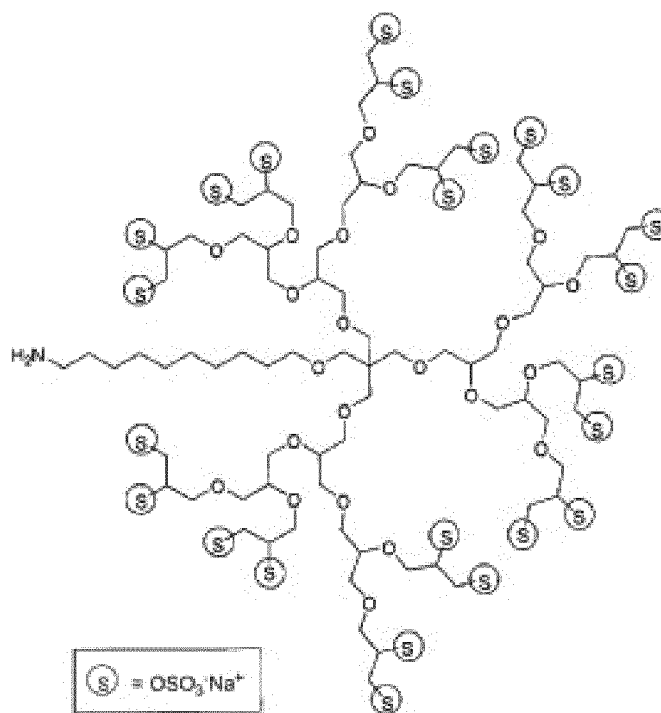
Сульфатизация 10-азидодецильного дендрона (OH_{24})

100 мг (0,053 ммоль) 10-азидодецильного дендрона (OH_{24}) растворяли в 0,5 мл сухого ДМФ и нагревали до 60°C. При перемешивании добавляли SO_3 -пиридиновый комплекс (245 мг, 1,54 ммоль), с последующим перемешиванием в течение 5 часов при 60°C и 18 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили водой, значение pH доводили до 9-10 с помощью 1 М NaOH, фильтровали и подвергали ультрафильтрации (MWCO 1000) с водой. После лиофилизации получали продукт 10-азидодецильный дендрон ($\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$)₂₄ (150 мг, 65%). Элементарный анализ показал полную сульфатизацию. N 0,863, C 21,70, S 17,83, H 3,042, молекулярная масса 4322 г/моль.

Пример 1e:

Синтез 10-аминодецильного дендрона ($\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$)₂₄ (соединение

d01)



К раствору 10-азидодецилдендрона $(\text{OSO}_3^- \text{Na}^+)_{24}$ (150 мг, 0,035 ммоль) в смеси вода/метанол 1:1 (2 мл) добавляли ТСЕР (60 мг, 0,2 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После упаривания остаток подвергали диализу против 20% NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1000) с выходом 107 мг (72%) соединения d01 после лиофилизации (молекулярная масса 4296 г/моль).

Пример, помимо декана, также может охватывать алкановые заместители, включая, например, использование 1,6-дибромгексана, 1,8-дибромоктана, 1,11-дибромундекана или других дибромалканов с использованием ненасыщенных, циклических или замещенных фрагментов в соответствии с описанием линкера L в общей формуле $\text{E} - [\text{G} - \text{L} - \text{D}(\text{OSO}_3^- \text{M}^+)_n]_m$. Кроме того, линкер может быть введен с помощью фрагмента ПЭГ-алкан, например, азидо-ПЭГ-алкилбромид/иодид (или мезилат, тозилат), такого как азидо-ПЭГ₃-10- $(\text{CH}_2)_{2-18} - \text{Br}$.

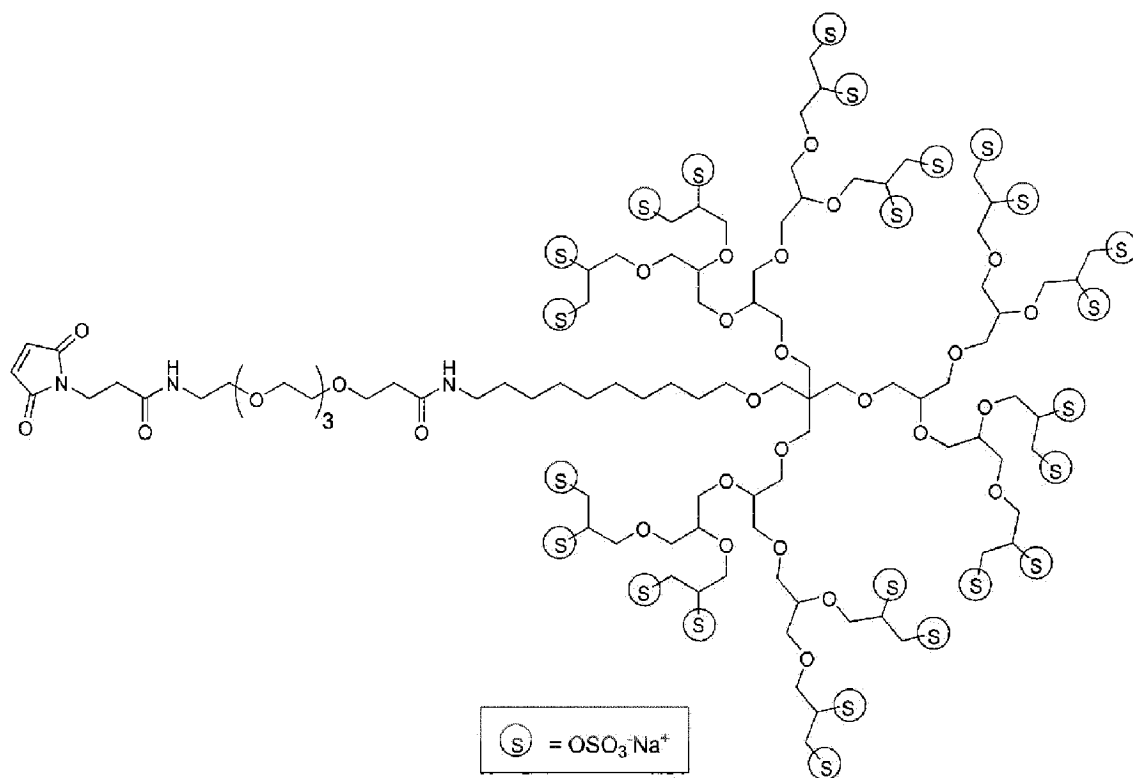
Пример 2:

Синтез полиглицеринновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и реакционноспособными группами для биоконъюгации из соединения d01 путем взаимодействия с

бифункциональными ПЭГ-СООН NHS сложными эфирами.

Пример 2а:

Синтез полиглицеринновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и реакционноспособной группой малеимида (соединение **d02**) из соединения **d01** путем взаимодействия с малеимида-ПЭГ(4)-СООН NHS сложными эфирами.



10 мг (2,33 мкмоль) соединения **d01** растворяли в 1 мл смеси ДМФ/вода 9:1 и добавляли сложный эфир малеимида-ПЭГ(4)-СООН NHS (3,0 мг, 5,83 мкмоль), с последующим встряхиванием при 40°C в течение 48 часов. Продукт (соединение **d02**) осаждали добавлением дихлорметана, центрифугированием и последовательно промыванием дихлорметаном, с последующей лиофилизацией из дистиллированной воды. Степень связывания определяли с помощью Н-ЯМР (700 МГц) на основе отношения сигналов малеимида (2H, S) и алифатического спейсера (мультиплеты <1,5, 16H) с получением 88% степени связывания для **d02** (MW 4694 г/моль).

Примеры 2b-h:

Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и дополнительными реакционноспособными линкерами осуществляется с использованием различных

бифункциональных ПЭГ-СООН NHS сложных эфиров, содержащих азидо, пропаргил, циклооктинил, пиридинилдисульфид, тиацетил или малеими́до группу. Взаимодействие с соединением **d01** осуществляли в соответствии с примером 2а (выход 70–85%). В таблице 1 приведены продукты **d03–d09**.

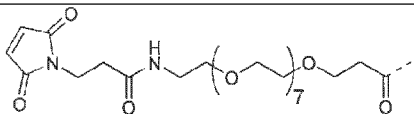
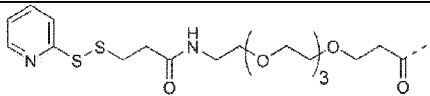
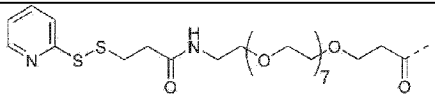
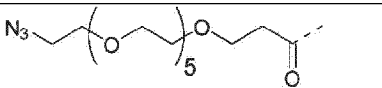
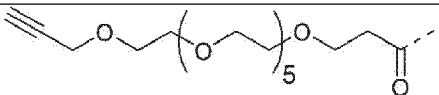
Пример 2i:

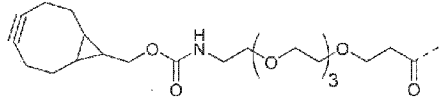
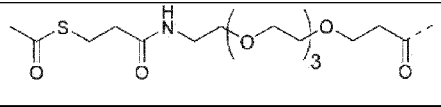
Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и изотиоцианатной группой для биоконъюгации (соединение **d10**)

Альтернативно аминогруппа может быть непосредственно превращена в изотиоцианатную группу. 10 мг (2,33 мкмоль) соединения **d01** растворяли в 0,5 мл ДМФ, и добавляли ди(2-пиридил)тионокарбонат (1,1 мг. 4,66 мкмоль), с последующим встряхиванием при 40°C в течение 6 ч. Продукт **d10** выделяли способом, описанным в примере 2а. Превращение контролировали инфракрасной спектроскопией на основе преобразования Фурье (FTIR) (2100 см^{-1}) (MW 4338 г/моль).

Таблица 1

Химически активные линкеры или группы, связанные с **d01**, и характеристика полученного продукта. (пунктирная линия обозначает связь с амино группой в **d01** с образованием амида)

Соединение	Линкерная структура	Молекулярная масса продукта (г/моль)	Отношение линкер: дендример
d03		4870	78
d04		4741	89
d05		4917	68
d06		4657	95
d07		4670	95

d08		4719	90
d09		4673	87

Вышеуказанные дендримерные системы типа **d01** следует рассматривать как иллюстративные, и они охватывают применение других количеств n , как и некоторые указанные здесь, например, путем удвоения гидроксильных групп аллилированием/дигидроксилированием с получением 48 сульфатных групп после сульфатизации, которые дают соединения по аналогии с **d03-d10**.

Пример 3:

Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и сложными эфирными группами NHS для биоконъюгации из примера 1d (азидо линкер) путем взаимодействия с бифункциональными пропаргил-ПЭГ-COOK линкерами.

Пример 3a:

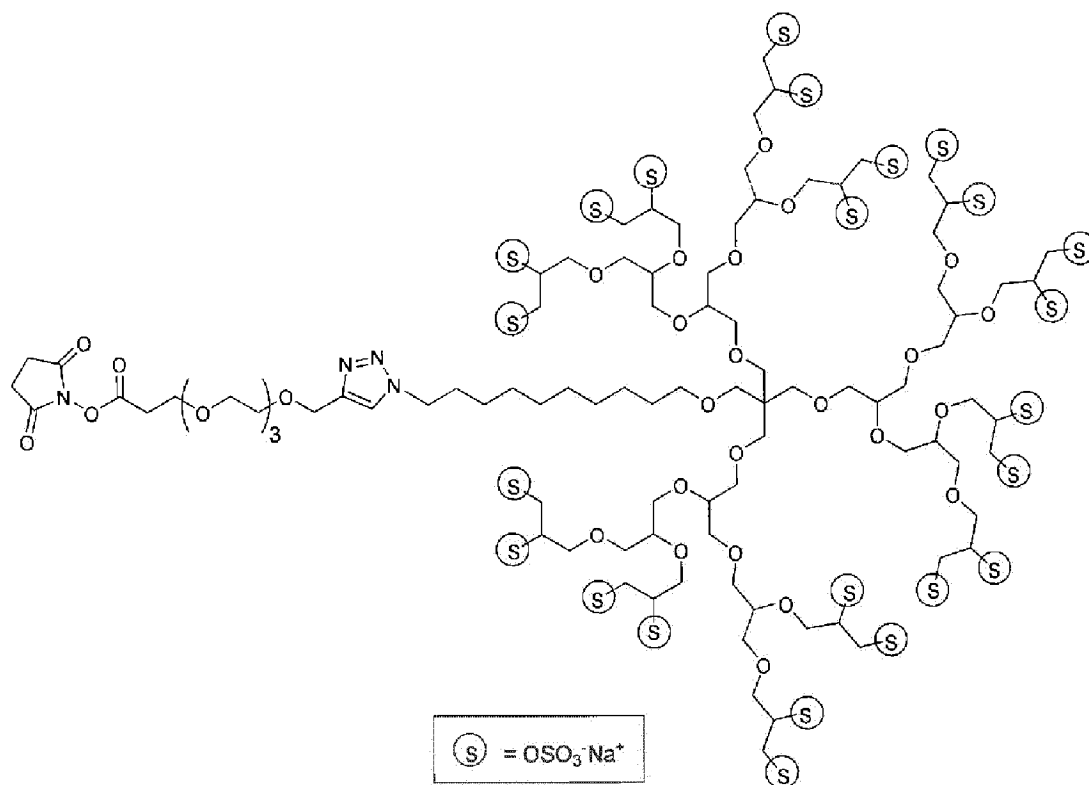
Клик-связывание азидо дендримера (пример 1d) с пропаргил-PEG(4)-карбоновая кислота-трет-бутиловым сложным эфиром.

К раствору 100 мг (0,023 ммоль) азидо дендримера (пример 1d) в 1 мл смеси вода/ДМФ (1:1), добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (5,7 мг, 0,023 ммоль), аскорбиновую кислоту (0,035 ммоль) и (0,058 ммоль) пропаргил-PEG4-COO^tбутиловый сложный эфир (Broadpharm Ltd., US) и смесь перемешивали при 80°C в течение 18 часов. Остаток, полученный после лиофилизации, суспендировали в смеси дихлорметана (5 мл), трифторуксусной кислоты (3 мл) и воды (0,1 мл), перемешивали в течение 5 часов при 40°C с получением группы свободной карбоновой кислоты. После упаривания остаток суспендировали в MeOH и осаждали в диэтиловом эфире, промывали дихлорметаном и выделяли центрифугированием. Остаток подвергали диализу против NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1 кДа), выход 80 мг карбокси дендримера (MW 4582 г/моль) после лиофилизации.

Пример 3b:

Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24

сульфатными группами и группой NHS сложного эфира для биоконъюгации (соединение **d11**)



К раствору 80 мг (17,5 мкмоль) карбокси дендримера (пример 3а) в 2 мл ДМФ добавляли 6 мкл (35 мкмоль) DIPEA, с последующим добавлением 13 мг O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметил-уран гексафторфосфата (HSTU; 35 мкмоль). Через 18 часов перемешивания при комнатной температуре продукт выделяли путем осаждения с помощью дихлорметана (повторные циклы ДМФ/CH₂Cl₂) и сушки в вакууме, с выходом 82 мг NHS сложного эфира (соединение **d11**; MW 4679 г/моль) в виде аморфного твердого вещества, используемого без дополнительной очистки.

Объем изобретения в отношении полиглицериновых дендримерных систем типа d11 показывает, что функциональная группа NHS сложного эфира может быть синтезирована на полисульфатированных дендримерах и не ограничивается примером, и может включать другие количества n сульфатных групп, например, путем удвоения гидроксильных групп посредством аллилирования/дигидроксилирования с получением 48 сульфатных групп после сульфатизации, или другие производные азидо-алкилкарбоновой кислоты для синтеза NHS сложных эфиров

сульфатированных дендримерных систем.

Пример 4

Синтез полиглицериновых дендримерных систем, содержащих 32 сульфатные группы и реакционноспособные группы для биоконъюгации (соединение **d12-d17**).

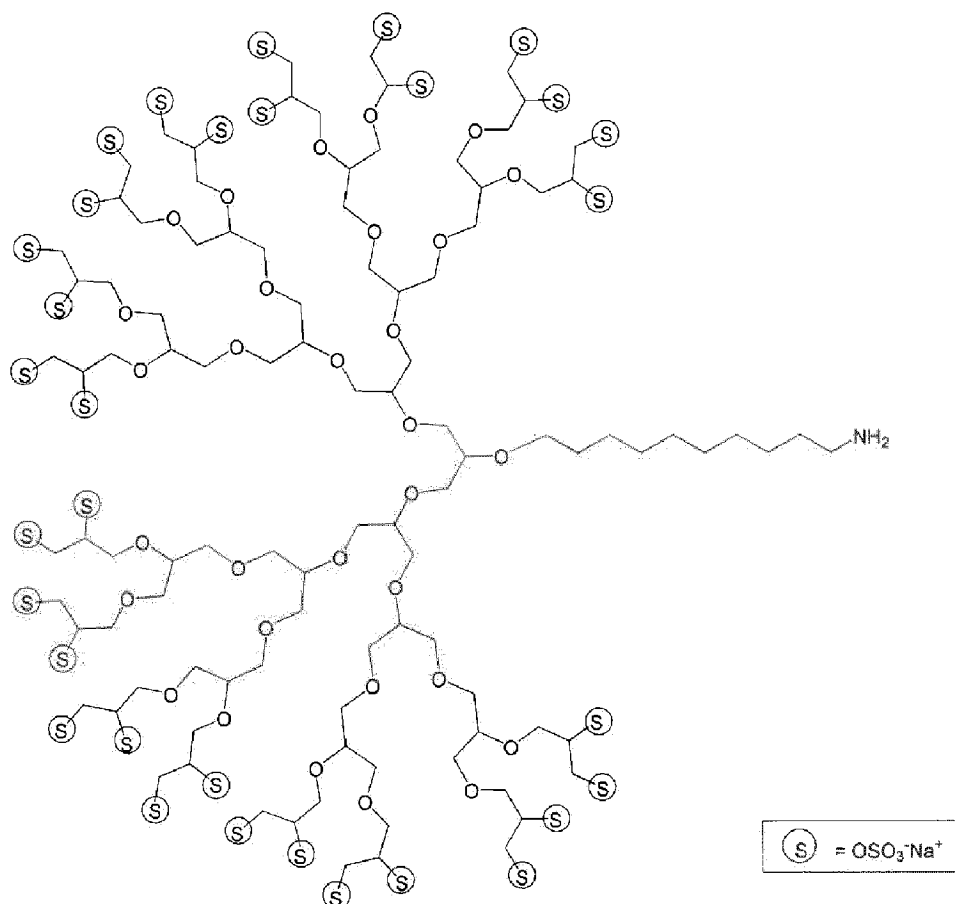
Пример 4a

Модификация полиглицеринового дендримера на основе полиглицеринового дендрона [G3.0]-ОН (Wyszogrodzka M. et al., Chemistry 2008, 14, 9202) с азидоундецильным линкером.

Раствор 0,3 г (0,21 ммоль) [G3.0]-ОН (16 групп ОН, защищенный ацеталь) в 2 мл сухого ТГФ подвергали взаимодействию с 1,10-дибромдеканом, а затем с NaN₃, как это описано в примере 1, с последующим отщеплением ацетальных групп в MeOH/HCl и очистки с помощью RP C-18 хроматографии (Licroprep), используя смесь вода/метанол с получением 0,15 г (52%) [G3.0]-O-(CH₂)₁₁-N₃ (MW 1355 г/моль).

Пример 4b

Синтез полиглицеринового дендримера с азидоундецильным линкером (пример 4a) путем аллилирования/дигидроксилирования, сульфатизации и восстановления с получением аминокундецил-дендримерной системы с 32 сульфатными группами (соединение **d12**).



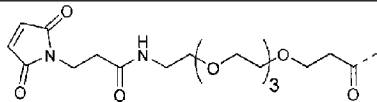
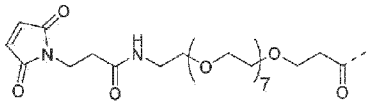
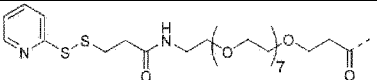
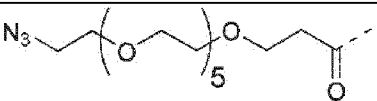
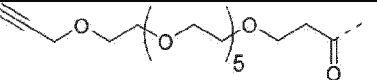
Синтез осуществляли способом, описанным в примере 1d-e с получением 155 мг продукта в виде **d12** в виде бесцветного аморфного твердого вещества (MW 5721 г/моль).

Пример 4с-h

Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и дополнительными реакционноспособными линкерами осуществляли путем использования различных функциональных ПЭГ-СООН NHS сложных эфиров, содержащий азидо, пропаргил, циклооктинил, пиридинилдисульфид, тиацетил или малеимидо группу. Взаимодействие с соединением **d01** проводили в соответствии с примером 2a/4c (выход 65-86%). В таблице 2 приведены получаемые продукты **d13-d17**.

Таблица 2

Реакционноспособные линкеры, связанные с **d12** и характеристика полученного продукта. (пунктирная линия указывает на связь с амино группой в **d12**, с образованием амида)

Соединение	Линкерная структура	Молекулярная масса продукта (г/моль)	Отношение линкер: дендример
d13		6119	87
d14		6295	82
d15		6341	75
d16		6082	90
d17		6095	94

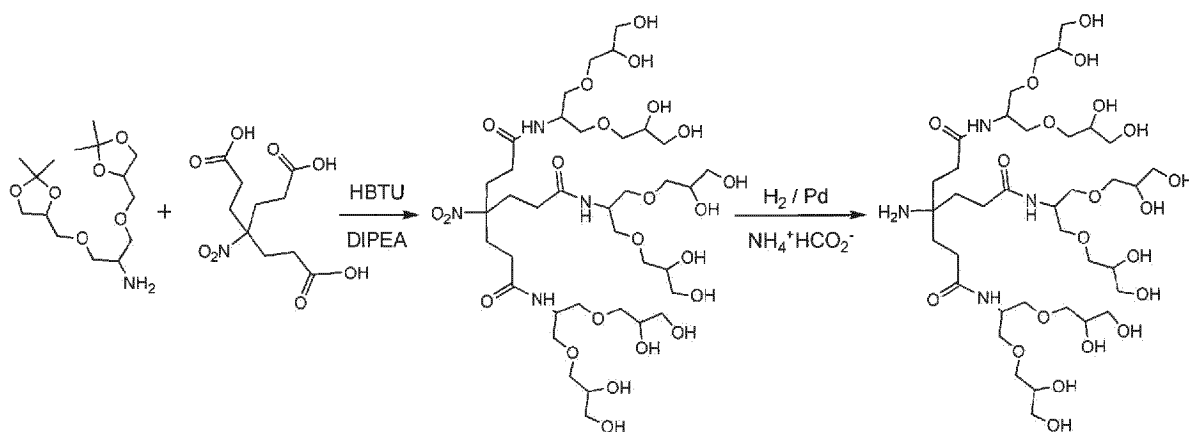
Объем изобретения в отношении полиглицериновых дендримерных систем типа d12 не ограничивается этими примерами и может включать другие количества n сульфатных групп, например, путем удвоения гидроксильных групп с помощью аллилирования/дигидроксирования с получением 64 сульфатных групп после сульфатизации, что дает соединения по аналогии с **d13-d17**.

Пример 5:

Синтез полиглицерин/амидо дендримерных систем с 24 сульфатными группами и реакционноспособными группами для биоконъюгации на основе аминотетра-трис (пропионовая кислота) и триглицерина (соединения **d18-d22**).

Пример 5а:

Синтез аминотетра-трис (пропионовая кислота) – трис (триглицерин) .



К раствору нитрометана-триспропионовая кислота (1,5 г, 5,4 ммоль) и DIPEA (3,9 г, 30 ммоль) в 15 мл ДМФ добавляли раствор HBTU (9,3 г, 24 ммоль) в 2 мл ДМФ. Через 30 мин перемешивания при комнатной температуре, к раствору (7,3 г, 23 ммоль) триглицеринамина, добавляли ацеталь-защищенный (1,3-бис[2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил)метокси]-2 пропиламин; согласно Wyszogrodzka M. et al, Chemistry 2008, 14. 9202) в 2 мл ДМФ, с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь упаривали досуха и отфильтровали через короткую колонку с силикагелем, элюируя смесью циклогексан/этилацетат. Содержащие продукт фракции собирали, упаривали и остаток растворяли в 20 мл метанола, к которому добавляли 1,7 мл конц. HCl для отщепления ацетальных защитных групп путем перемешивания в течение еще 24 часов. После упаривания досуха, остаток очищали с помощью RP C-18 хроматографии (Licroprep), используя смесь воду/метанол; выход (53%) промежуточного продукта составлял 2,7 г (Н-ЯМР, МС ESI). Восстановление нитро группы до amino группы достигается путем растворения 2,7 г промежуточного соединения в 120 мл метанола, к которому добавляли Pd/C (0,3 г) и формиат аммония (1,27 г, 20 ммоль). Смесь гидрировали при давлении 5 бар/комнатная температура в течение 48 часов, с последующей фильтрацией через целит, упаривания и RP C-18 хроматографии, как описано выше, с получением 1,9 г (74%) аминометил-трис (пропионовая кислота)-трис (триглицеринамид) в виде вязкого масла.

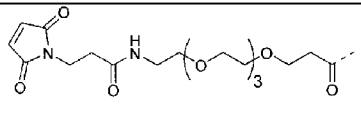
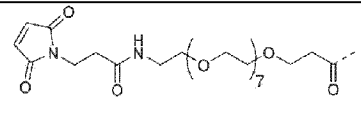
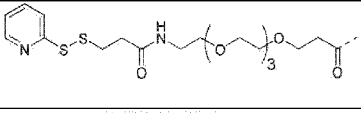
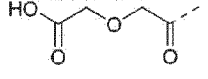
Пример 5b:

Модификация линкера посредством 11-азидоундекан карбоновой

Синтез полиглицерин/амидо дендримерных систем с 24 сульфатными группами и дополнительными реакционноспособными линкерами осуществляли путем использования различных бифункциональных ПЭГ-СООН NHS сложных эфиров, содержащих азидо, пропаргил, циклооктинил, пиридинилдисульфид, тиацетил или малеимидо группу. Взаимодействие с соединением **d01** проводили в соответствии с примером 2а/4с (выход 65-86%). В таблице 3 приведены получаемые продукты **d19-d22**. Другим вариантом является дериватизация amino группы с ангидридами, такими как ангидрид дигликолевой кислоты, известными способами для введения свободной карбоновой кислоты (продукт **d22**) или преобразования amino группы в изотиоцианатную группу (продукт **d23**; смотри также пример 2i).

Таблица 3

Реакционноспособный линкеры, связанные с **d18**, и характеристика полученного продукта (пунктирная линия указывает на связь с amino группой в **d18** с образованием амида)

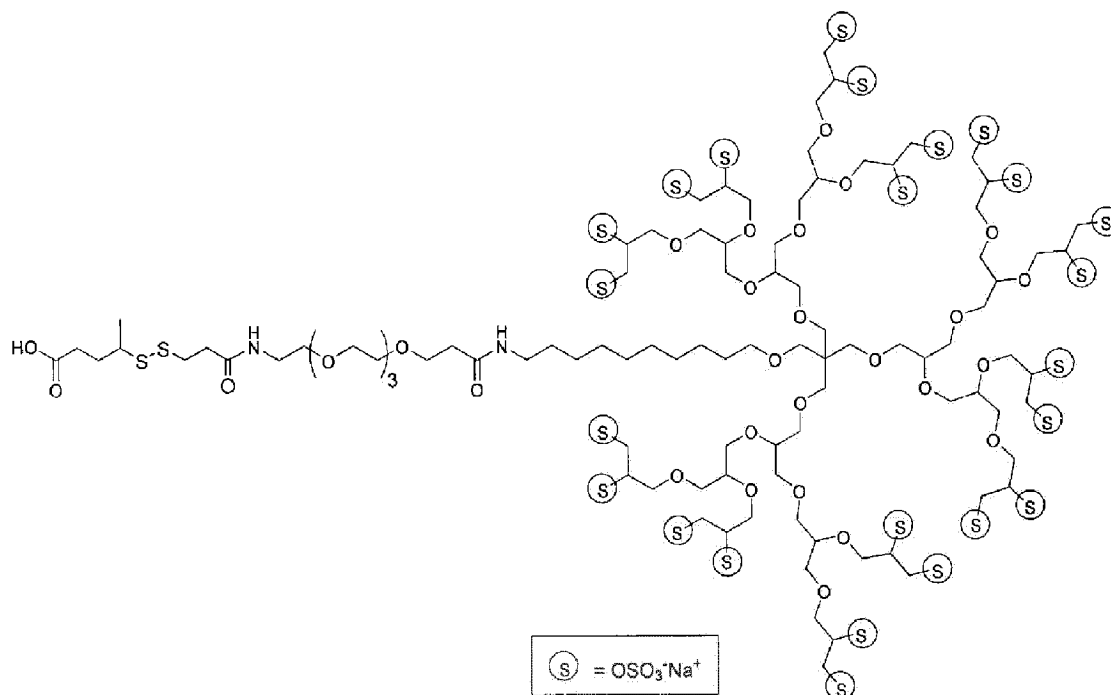
Соединение	Линкерная структура	Молекулярная масса продукта (г/моль)	Отношение линкер: дендример
d19		4830	90
d20		5006	79
d21		4876	86
d22		4548	98

Объем изобретения в отношении полиглицериновых дендримерных систем типа **d18** не ограничивается этими примерами и может включать другие количества *n* сульфатных групп, например, путем удвоения гидроксильных групп с помощью аллилирования/дигидроксирования с получением 48 сульфатных групп после сульфатизации, что дает соединения по аналогии с

d19-d22.

Пример 6

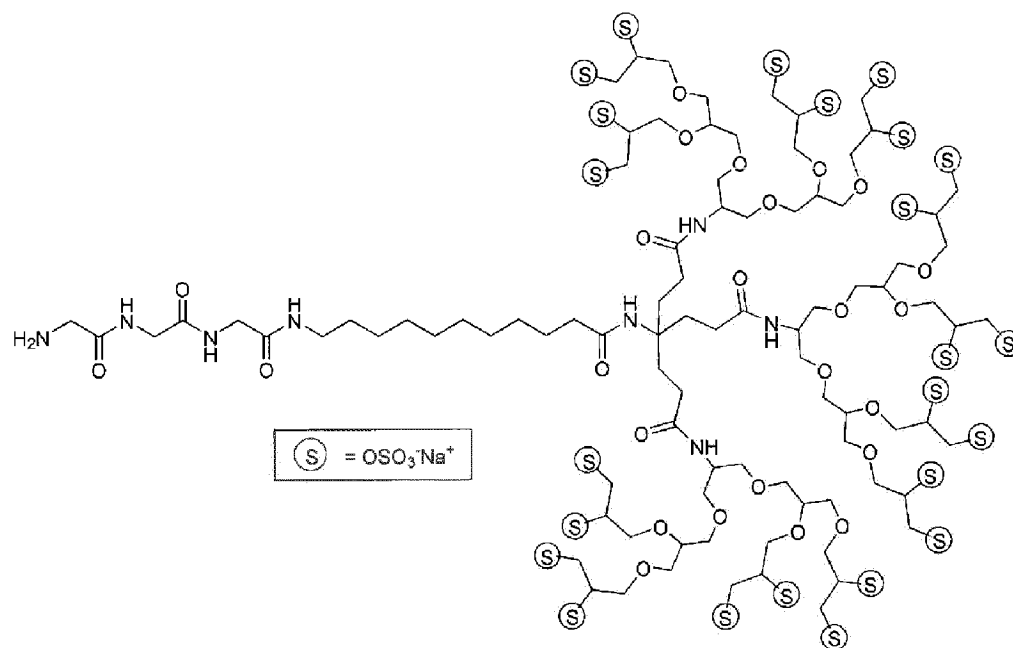
Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами, реакционноспособной группой NHS сложного эфира и восстановительно расщепляемым дисульфидным звеном в линкере (соединение **d24**).



Раствор соединения **d09** (пример 2h) (25 мг, 5,3 мкмоль) и 20 мг ионообменной смолы Dowex® 50W в 0,5 мл смеси метанол/ДМФ 1:1 встряхивали в течение 3 часов, фильтровали и упаривали досуха. Остаток растворяли в фосфатно-солевом буфере (50 мМ; pH 7,4, включая 1 мМ ЭДТК)/метанол 1:1, к которому добавляли 4-(2-пиридилдитио)бутановую кислоту (2,4 мг, 10,6 мкмоль; Widdison et al., J. Med. Chem. 2006, 49. 4392). Через 18 часов перемешивания остаток упаривали и подвергали диализу против 20% NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1000), выход 21 мг соединения **d24** в виде лиофилизата (MW 4764 г/моль).

Пример 7

Синтез полиглицериновой/амидо дендримерной системы с 24 сульфатными группами и триглицидным мотивом для сортаза-опосредованного ферментативного сшивания (**d25**).



Вос-GiyGlyGly-OH (Bachem; 25 мг, 0,085 ммоль) и DIPEA (11 мг, 0,17 ммоль) растворяли в 3 мл ДМФ и добавляли HATU (38 мг, 0,1 ммоль). Через 1 час добавляли соединение **d18** (95 мг, 0.021 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 48 часов. Продукт осаждали добавлением диэилового эфира и собирали фильтрованием. Остаток повторно промывали дихлорметаном и затем суспендировали в 5 мл смеси дихлорметан/трифторуксусная кислота 1:1, с последующим перемешиванием в течение 5 ч при комнатной температуре.

Пример 8

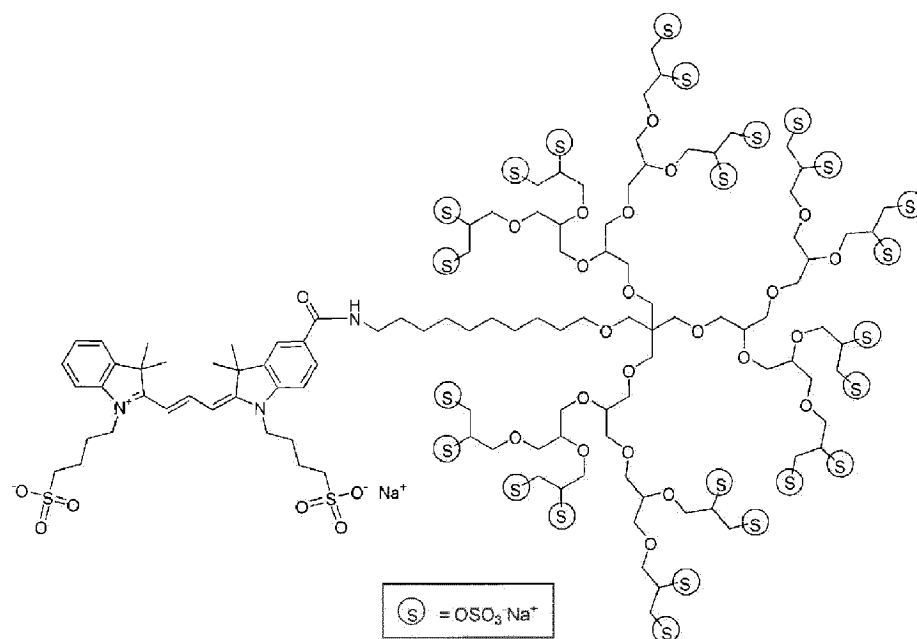
Синтез конъюгатов дендримерных систем с флуоресцентным красителем ICC

Пример 8а-с

Конъюгация amino дендримерных соединений **d01**, **d12** и **d18** с цианиновым красителем.

Цианиновые красители для мечения, такие как Cy3 или ICC, с использованием различных функциональных групп и схем замещения, можно синтезировать в соответствии с известной литературой. Краситель ICC (NHS сложный эфир) представляет собой известный краситель видимого диапазона длин волн (диапазон флуоресценции ~ 550 нм/575 нм) (Groger et al, Bioconjugate Chem 2013, 24,

1507).



10 мг (2,33 мкмоль) соединения **d01** растворяли в 1 мл смеси ДМФ/вода (9:1) и добавляли NHS сложный эфир ICC (NHS сложный эфир MiDye550, Iris Biotech., Germany) (8,9 мг, 12 мкмоль), с последующим встряхиванием при 40°C в течение 72 часов. Продукт (ICC-**d01**) осаждали добавлением дихлорметана и очищали RP C-18 хроматографией (Licroprep), используя смесь вода/метанол. Степень связывания определяли посредством спектрофотометрии (ICC краситель λ_{max} при 550 нм, ϵ 120000 L⁻¹M⁻¹) с получением 54% степени связывания. Дендримеры **d12** и **d18** ковалентно конъюгировали с NHS сложным эфиром красителя ICC аналогичным образом.

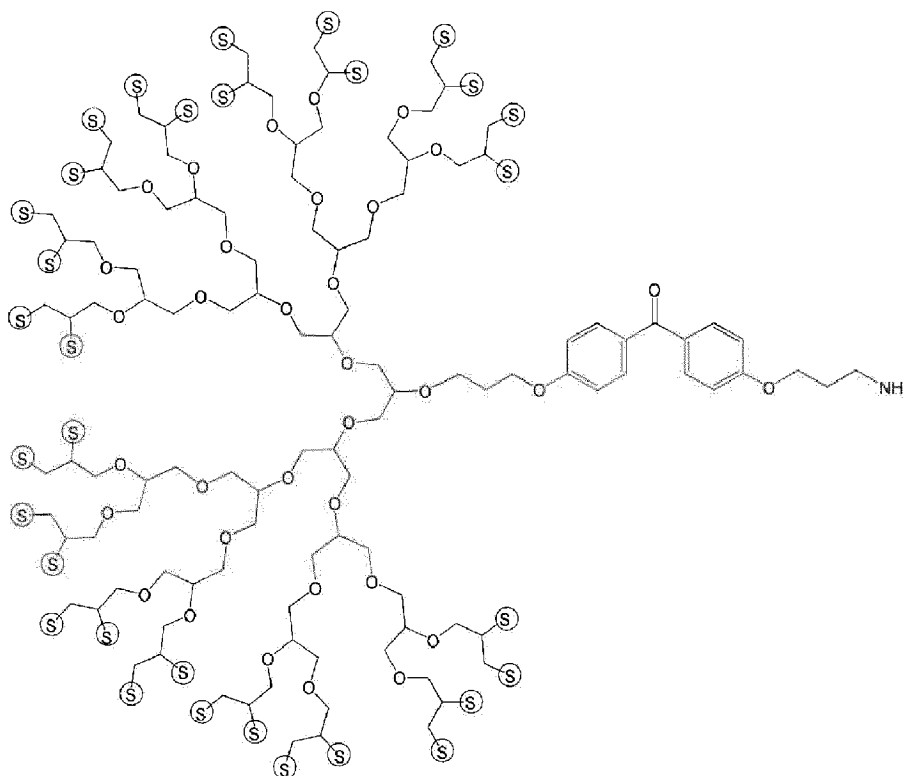
Другие NHS сложные эфиры флуоресцентного красителя могут быть конъюгированы способом, описанным в настоящем документе, например, NHS сложный эфир цианинового красителя, NHS сложные эфиры Cy3-Cy7, NHS сложные эфиры родамина или флуоресцеина. Кроме того, могут быть использованы широко известные изотиоцианатные производные (ITC) таких красителей, например, FITC.

Другой способ конъюгация красителя заключается в использовании amino дендримеров (например, **d01**, **d12**, **d18**) в сочетании с красителями 2-иминитиолом и малеимидом (например,

ИСС малеимид) с получением, например, ИСС-IT-**d01** или ИСС-H-**d18**.

Пример 9

Синтез дендримера с УФ-обнаруживаемым линкером (**d26**)



Синтез **d26** осуществляли по аналогии с примером 4, используя в качестве линкера 4,4'-ди-(3-бромпропилокси)бензофенон (Yan et al., Bioorg. Med. Chem. 2013, 21, 508) вместо 1,10-дибромдекана. Затем дендример **d26** может быть дополнительно модифицирован способом, описанным в примерах 4с-h, которые будут использоваться для белковой конъюгации. 4,4'-Ди-(3-бромпропилокси)бензофеноновые линкеры могут быть использованы для синтеза дендримеров типа примеров 1-3.

Пример 10

Синтез дендримера с линкером на основе обнаруживаемого в видимой области спектра цианинового красителя (**d28**)

Пример 10а

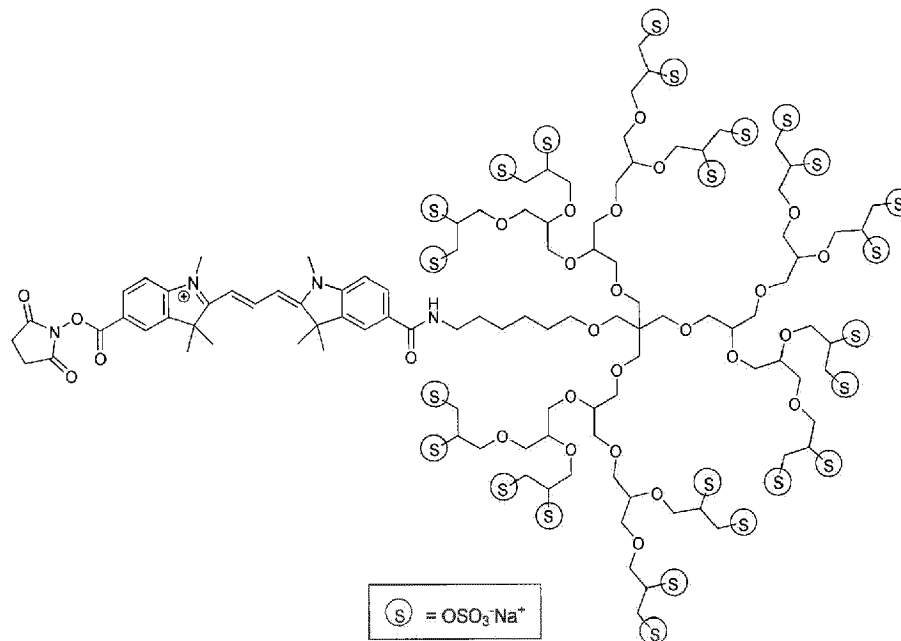
Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и аминотетраэтильным линкером (соединение **d27**).

Соединение **d27** является аналогом **d01** с аминотетраэтильной группой и синтезируется в соответствии с примером 1а-е,

используя 1,6-дибромгексан в качестве исходного вещества; молекулярная масса **d27** составляет 4240 г/моль.

Пример 10b

Конъюгация с индоцианиновым фрагментом в качестве обнаруживаемого в видимой области спектра линкера и реакционноспособной группы NHS сложного эфира (**d28**).



5,5'-Дикарбокси-1,1'-диметилиндокарбоцианин моноацетат синтезировали в соответствии с известными процедурами. К раствору 0,1 г (0,2 ммоль) указанного красителя и DIPEA (0,11 г, 0,8 ммоль) в 3 мл ДМФ добавляли раствор HBTU (0,31 г, 0,8 ммоль) в 0,5 мл ДМФ. Через 90 мин перемешивания при комнатной температуре добавляли частями в виде твердого вещества **d027** (0,17 г, 0,04 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 60°C в течение 72 часов. Продукт осаждали добавлением 3 мл диэтилового эфира и собирали центрифугированием. Очистка с помощью RP C-18-хроматографии (Licroprep), с использованием смеси вода/метанол, давала 0,12 г промежуточного соединения после лиофилизации. Превращение в NHS сложный эфир осуществляли путем добавления к раствору промежуточного соединения HSTU (75 мг, 0,2 ммоль) и 35 мкл DIPEA в 1 мл ДМФ и перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим осаждением в диэтиловом эфире (повторные циклы смеси ДМФ/диэтиловый эфир), с получением

0,10 г продукта **d28** (молекулярная масса 4743 г/моль).

Пример 11

Синтез конъюгатов дендримерных систем с белками и антителами.

Пример 11a

Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с малеимидо группами (**d02, d03, d13, d14, d19, d20**):

Раствор 2 мг белка в 1 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 7,4/10 мМ ЭДТК подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. 2-иминотиолана в течение 60 мин. К указанной смеси добавляли 14 моль-экв. малеимидо-функционализированного дендримера (например, **d02, d03, d13, d14, d19, d20**), с последующей инкубацией в течение 18 ч. Смесь подвергали очистке в ТРИС-буферизированный физраствор (TBS, pH 7,4), с использованием колонки NAP 10 или кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа).

Пример 11b

Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с пиридилдисульфидной группой (**d04, d05, d15, d21**): Раствор 2 мг белка в 1 мл, 50 мМ фосфатного буфера с pH 7,4/10 мМ ЭДТК подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. 2-иминотиолана в течение 60 мин. К указанной смеси добавляли 10 моль-экв. малеимидо-функционализированного дендримера (например, **d04, d05, d15, d21**), затем инкубировали в течение 3 ч. Смесь подвергали очистке в ТРИС-буферизированный физраствор (TBS, pH 7,4) с использованием колонки NAP 10 или кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа).

Пример 11c

Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с изотиоцианатом или группой NHS сложного эфира (**d10, d11, d23**): Раствор 2 мг белка в 1 мл PBS с pH 7,4 подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. дендримера на основе изотиоцианата или NHS сложного эфира (например, **d10, d11, d23**) в течение 24 часов. Смесь подвергали очистке в ТРИС-буферизированный физраствор (TBS; pH 7,4) с использованием колонки NAP 10 или кассеты для диализа Slide-A-Lyzer

(регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа).

Пример 12

Синтез конъюгатов дендримерных систем с ферментами.

Пример 12а

Конъюгация дендримерных систем с малеимидами группами (**d02**, **d13**, **d19**) с ферментом L-аспарагиназа.

L-аспарагиназа представляет собой гомотетрамер, состоящий из 4-х звеньев с молекулярной массой 34 кДа, который может быть модифицирован на дисульфидном мостике в каждом из мономерных звеньев (Balan et al., Bioconjugate Chem 2007-, 18, 61). L-аспарагиназу (10 мг, 0,29 мкмоль мономер: L-аспарагиназа 5000Е, Medac Germany) растворяли в 2 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 8/10 мМ ЭДТК. Добавляли дитиотреитол (ДТТ; 80 мг) и раствор встряхивали в течение 1 ч. Избыточное количество дитиотреитола (DTT) удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (Sephadex G50; фосфатный буфер с pH 8/10 мМ ЭДТК). К полученному раствору (приблизительно 8 мг в 4 мл, что измерено с помощью УФ) добавляли раствор 2,3 мкмоль (8 моль-экв.) малеимида дендримера (например, **d02**, **d13**, **d19**) в приблизительно 0,2 мл воды с последующей инкубацией в течение 24 часов при осторожном встряхивании. Очистку выполняли с помощью ультрафильтрации (centriprep flasks, регенерированная целлюлоза, MWCO 20.000).

Пример 12b

Конъюгация дендримерных систем с малеимидо группой (**d02**) с ферментом ДНКазы.

Синтез осуществляли способом, описанным в примере 11а, с получением ДНКазы-**d02** в виде раствора в TBS с pH 7,4.

Пример 12с

Конъюгация дендримерных систем с изотиоцианатной группой (**d10**) с ферментом ДНКазы.

К раствору 2 мг (65 нмоль) ДНКазы (дезоксирибонуклеаза I из бычьей поджелудочной железы, 31 Да) в 1 мл PBS, pH 7,4 добавляли 5 моль-экв. изотиоцианатного дендримера **d10** (1,4 мг) в 0,2 л PBS, с последующим взаимодействием при комнатной температуре в течение 18 часов. Очистку осуществляли с помощью

кассет для диализа Slide-A-Lyzer (сложный эфир целлюлозы, MWCO 10 кДа) в TBS с pH 7,4.

Таблица 4

Протеиновые конъюгаты с дендримерными системами в соответствии с примерами 11 и 12

белок	дендример	конъюгированный продукт в соответствии с общей формулой I
сапорин	d02, d13, d19	сапорин-d02 сапорин-d13 сапорин-d19
овальбумин	d02, d03, d20, d28	ova-d02 ova-d03 ova-d20
белок	дендример	продукт конъюгации в соответствии с общей формулой I
сапорин	d02, d13, d19	сапорин-d02 сапорин-d13 сапорин-d19
овальбумин	d02, d03, d20, d28	ova-d02 ova-d03 ova-d20 ova-d28
апоптин	d02, d13	apo-d02 apo-d13
дифтерийный токсин	d02, d13	dph-d02 dph-d13
человеческий сывороточный альбумин (HSA)	d21	HSA-d21
рекомбинантный цистеиновый белок G	d02, d13, d19	ProtG-d02 ProtG-d13 ProtG-d19
бевацизумаб	d10, d11, d13	bev-d11

		bev-d23
IgG	d22	IgG-d22
	d28	IgG-d28
L-аспарагиназа	d02, d13, d19	asp-d02
		asp-d13
		asp-d19
ДНКаза	d02, d10	ДНКаза-d02
		ДНКаза-d10

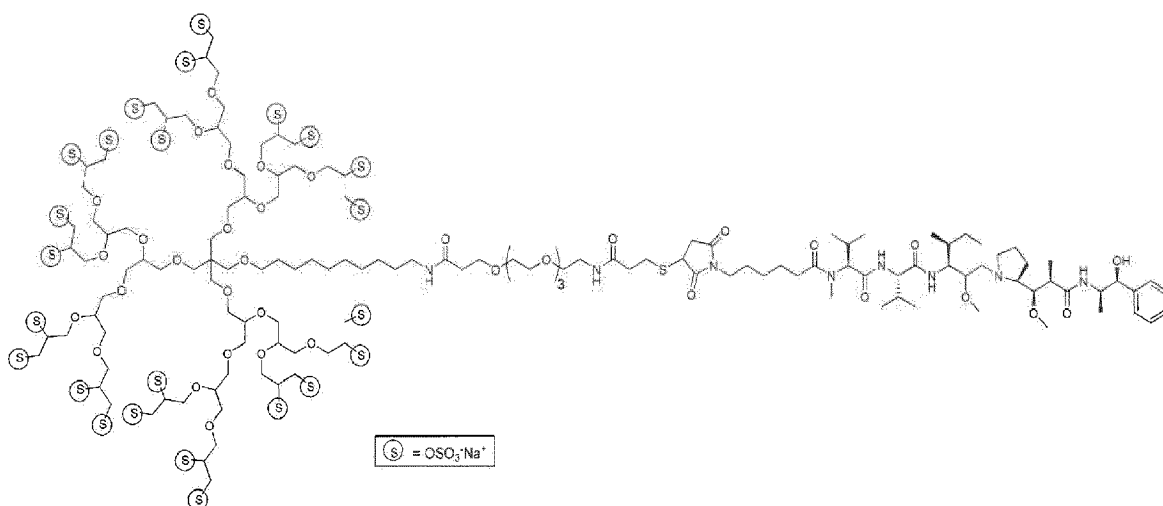
Протеиновые конъюгаты с дендримерными системами в соответствии с таблицей 4 могут быть дополнительно конъюгированы с флуоресцентными красителями для обнаружения конъюгатов в биологических системах. Флуоресцентное мечение представляет собой известную процедуру и может быть выполнено с различными реакционноспособными флуорофорами. При этом NHS сложный эфир красителя ICC (Groger et al., Bioconjugate Chem 2013, 24, 1507) используют в примерах, демонстрирующих результаты клеточного захвата с помощью FACS и микроскопии.

Пример 13

Синтез конъюгатов дендримерных систем с низкомолекулярными пептидами и пептидомиметиками

Пример 13а

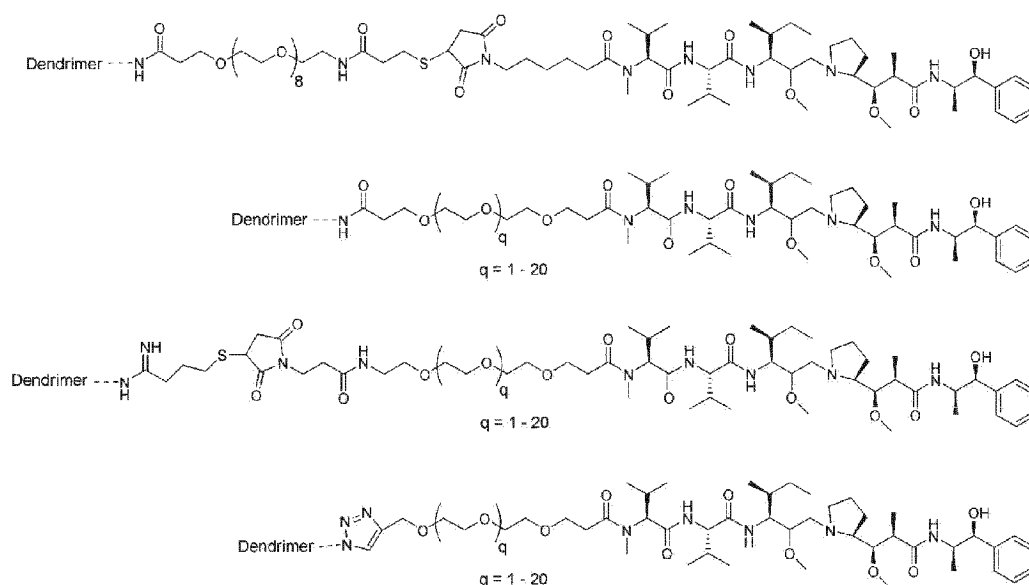
Синтез конъюгата дендримера с монометил ауристатином Е



Малеимидапроил-монометил ауристатин Е (mc-MMAE) может быть синтезирован в соответствии с литературой (Doronina et al., 2006, 17, 114). Конъюгация достигалась путем растворения

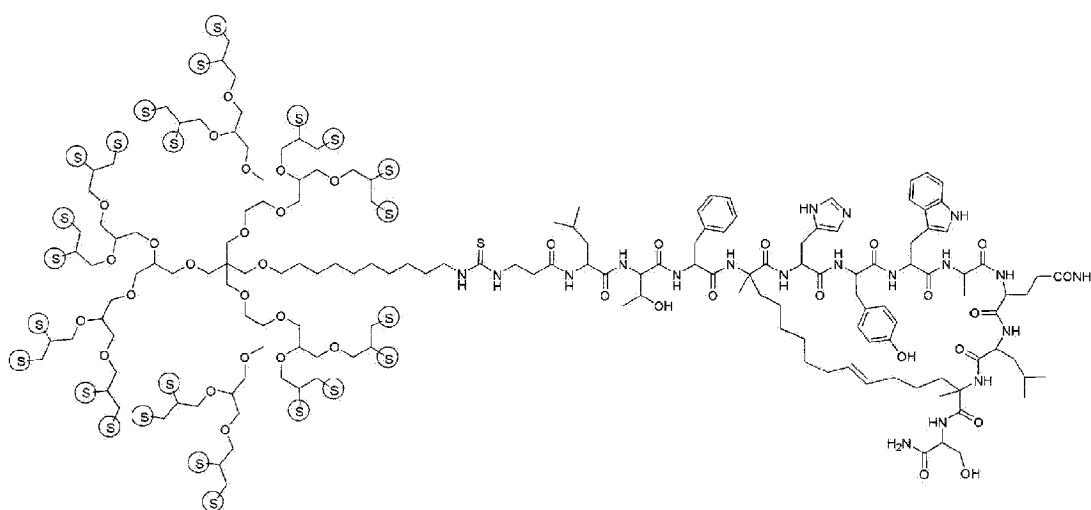
дендримера **d09** (2 мг, 0,43 мкмоль) в 0,5 мл водного раствора гидроксилamina с концентрацией 50 мМ, с последующим добавлением малеимидокапроил-монометил ауристатина Е (0,37 мг в 0,5 мл ДМФ/PBS 1:1). После инкубирования в течение 18 часов при 25°C продукт осаждали с помощью дихлорметана, с последующей 11 ПТХ очисткой (вода/метанол) с получением ММАЕ-**d09** (1,1 мг).

Другие неограничивающие примеры структур дендримеров **d01** с ауристатиновыми эффекторными молекулами, которые синтезируются в соответствии с методами, описанными в настоящем документе, могут включать:



Пример 13b

Синтез конъюгата дендримера с волокнистым пептидом



Волокнистый пептид для активации пути p53 (ATSP-3900 с N-терминальным В-аланином) может быть синтезирован в соответствии

с литературой (Chang et al., PNAS 2013 110, E3445). Конъюгация достигается путем растворения дендримера **d10** (2 мг, 0,46 мкмоль) в 50 мл 0,5 ММ фосфатного буфера с pH 8. К указанному раствору добавляли раствор В-аланил-ATSP-3900 (0,65 мг, 0,40 мкмоль) в 0,2 мл ДМФ, с последующим взаимодействием при 40°C в течение 24 часов. Очистку осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (вода/метанол) с получением конъюгата ATSP3900-**d10** (0,8 мг).

Пример 13с

Синтез дендримерных конъюгатов с пептидами, имеющими альфа-спиральные структуры, полученными из природных связывающих мотивов

Пептидные последовательности **P1-P7** (в качестве С-терминальных амидов) синтезировали посредством общего твердофазного пептидного синтеза. Эти пептиды несут N-концевой цистеин для конъюгации малеимидо дендримеров с тиольной группой. Осуществляли конъюгацию с дендримерами d02, d03, d13, d14, d19. В качестве примера, описана процедура применения дендримера d02:

1 мг пептида растворяли в 200 мкл ДМФ и дополнительно растворяли 50 мМ фосфатным буфером (до 500 мкл). К этому раствору добавляли 5 моль-экв. TCEP (исходный раствор в воде), затем 0,9 моль-экв. дендримера, растворенного в 200-300 мкл воды. Смесь осторожно встряхивали при 25°C в течение 18 часов. Очистку осуществляли посредством ВЭЖХ (вода/ацетонитрил) или эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, вода/ДМФ), или сочетания обоих этих методов, с получением конъюгатов, перечисленных в таблице 5.

Таблица 5

Пептидные конъюгаты с дендримерами в соответствии с примером 13с

#	Исходный белок	Последовательность синтезированного пептида для конъюгации	конъюгаты
P1	BIM	CGMRPEIWIAQELRRIGDEFNA	d02-P1

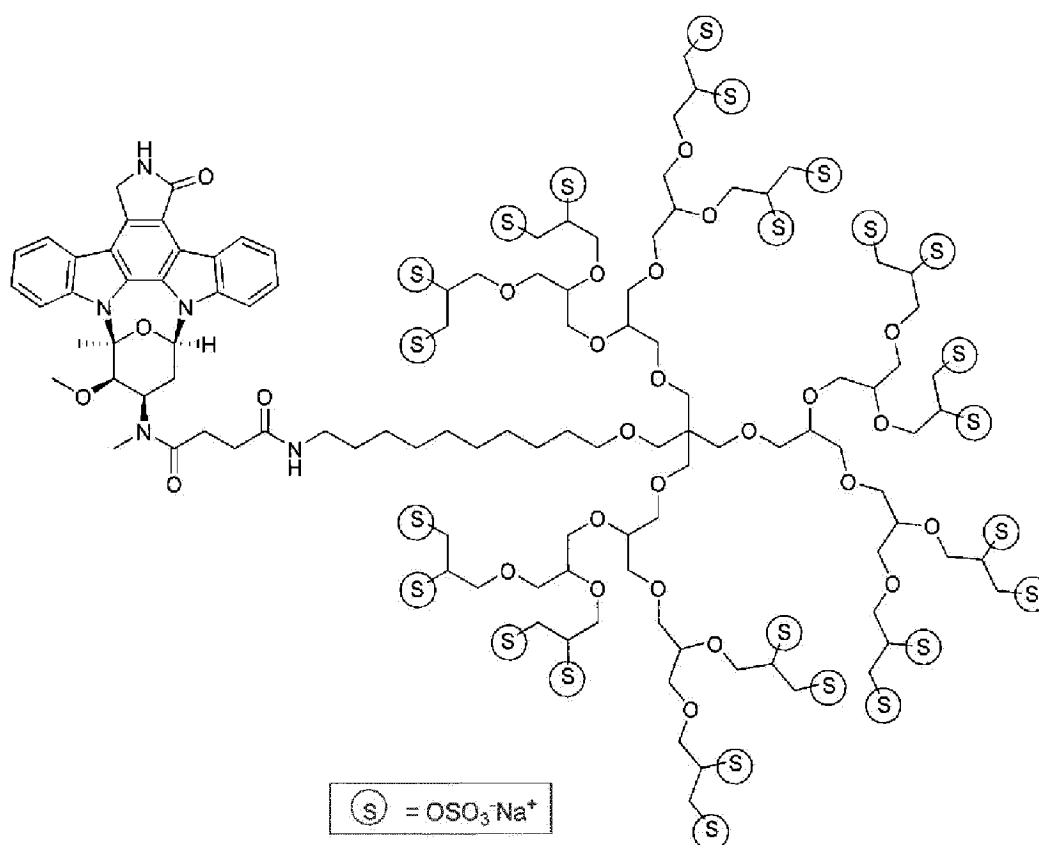
P2	BIM	CGDMRPEIYI (Aib) QELRRIGD (Aib) Y	d02-P2
P3	Bc19	CGLSQEQLEHRERSLQTLRDIQRMLF	d02-P3, d03-P3
P4	Bc19/2	CGLSKEQLEHRERSLQTLRDIERLL	d02-P4, d03-P4
P5	PUMA	CGEEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	d02-P5
P6	BID	CGEDIIRNIARHAAQVGASADRSI	d02-P6
P7	c-myc	CPKVVLKKATAYILSVQAEEQKL	d02-P7

Пример 14

Синтез конъюгатов дендримерных систем с низкомолекулярными ингибиторами

Пример 14а

Синтез дендримерного конъюгата с стауроспорином

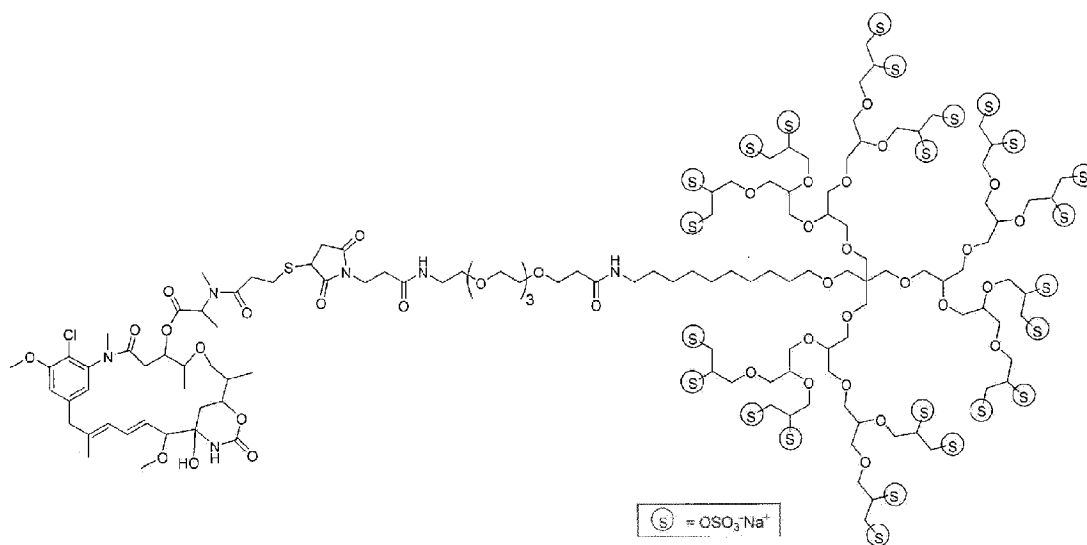


Стауроспорин представляет собой ингибитор киназ, который может быть конъюгирован с молекулами-носителями с сохранением своей ингибирующей активности. Сукциноил-стауроспорин синтезировали описанным способом, (Caravatti et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 399) и конъюгировали с **d01** в ДМФ с

использованием условий HATU/DIPEA связывания.

Пример 14b

Синтез дендримерного конъюгата с производным майтансина



$N^{2'}$ -диацетил- $N^{2'}$ -(3-меркапто-1-оксопропил) майтансин

является известным производным, подходящим для ковалентной конъюгации с биомолекулами посредством дисульфидных связей или малеимида групп (Erickson et al. Bioconjugate Chem. 2010, 21, 84). Ковалентная конъюгация с дендримерными системами (**d02**, **d03**, **d13**, **d19**, **d20** (малеимиды) является возможной. Приведенный в качестве примера раствор $N^{2'}$ -диацетил- $N^{2'}$ -(3-меркапто-1-оксопропил)майтансина (5 мг, 6,8 мкмоль) и дендримера **d02** (24 мг, 5,2 мкмоль) в 0,5 мл ДМФ/50 мМ фосфатный буфер с pH 7,0+5 мМ ЭДТК (9:1) подвергали взаимодействию в течение 3 ч при комнатной температуре, продукт осаждали добавлением 1 мл дихлорметана. Избыточное количество майтансина удаляли путем повторных циклов осаждения из смеси ДМФ/дихлорметан, что давало 21 мг **mau-d02** (молекулярная масса 5432 г/моль).

Пример 15

Клеточный захват конъюгатов дендример-ИСС краситель (пример 8) и конъюгатов дендример-белок (пример 11)

Линии клеток злокачественной опухоли человека A2780 и QGP-1 культивировали в среде RPM1 с добавлением 10% телячьей эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2% глутамина и пенициллина/стрептомицина. Все клетки высевали в культуральную

среду при концентрации 1×10^5 клеток/мл и культивировали при 37°C с 5% CO_2 и разделяли 1:5 два раза в неделю. Линии эпителиальных клеток злокачественной опухоли человека A549, MCF7, HaCaT и HsrG2 выращивали в среде DMEM (PAN Biotech) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FCS, 2% глутамина и пенициллина/стрептомицина. Клетки высевали в среду при концентрации 1×10^5 клеток/мл (37°C с 5% CO_2 , разделяли 1:5 два раза в неделю). Клетки HT29 культивировали в среде Маккоя (PAN Biotech), с добавлением 10% FCS, 2% глутамина и пенициллин/стрептомицин. Клетки высевали в среде с концентрацией 1×10^5 клеток/мл (37°C с 5% CO_2 , разделяли 1:10 два раза в неделю). Для клеточной микроскопии, клетки высевали при концентрации 2×10^5 клеток/мл в 24-луночный культуральный планшет с покровным стеклом (Sigma), культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C , а затем культивировали в среде, содержащей 10^{-6} М ICC-d01, ICC-d12, ICC-d18 или соответствующие производные с 48 сульфатными группами или конъюгаты дендримера с белками (примеры 12 и 13) или 10^{-6} М глицерин-ICC (контроль), в течение до 24 часов при температуре 37°C . Затем клетки фиксировали охлажденным ацетоном, промывали и окрашивали 4,6-диамидино-2-фенил индолом (DAPI, Abeam) для контрастного окрашивания ядер. Получение изображений осуществляли с помощью микроскопа Leica DMRB (Leica). Изображения получали с помощью цифровой камеры (Spot 32, Diagnostic Instruments), с одним и тем же временем экспозиции для всех изображений. На фиг. 8А показан пример внутриклеточного распределения в цитозольных областях (ICC-d01, пример 8).

Для количественного определения клеточного захвата, опосредованного сульфатированными дендримерами, ICC-d01 (пример 8) используется для инкубирования 10^7 опухолевых клеток SKBr3 с 10^{-6} М ICC-d01 в течение 24 ч. Это количество и время является достаточным для измерения супернатанта посредством объединения и лизиса клеток с DMSO. На фигуре 8 В показан результирующий спектр поглощения (ICC коэффициент экстинкции (559 нм) $150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), дающий 10^{-17} моль на клетку, что соответствует

приблизительно 5 мио-молекулам на клетку.

Для исследований методом FACS, 2×10^5 клеток/мл клеток культивировали в 24-луночных планшетах с нормальной культуральной средой или средой, содержащей различные концентрации исследуемых веществ, в течение 3 или 24 часов. Потом клетки промывали PBS, и затем отделяли 200 мкл/лунка аккутазы (PAA) и промывали два раза PBS. Клетки фиксировали 500 мкл 3% параформальдегида в течение 10 мин при температуре 4°C, промывали 2 мл PBS и центрифугировали при 250 x g в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатанты удаляли и клетки суспендировали в 200 мкл PBS с 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Roth).

Фиксированные клетки хранили при температуре 4°C до проведения анализа с помощью прибора FACS Calibur (Becton-Dickinson). В таблице 5 приведены примеры анализа методом FACS.

Таблица 5

Значения захвата, измеренного методом FACS, относительно ICC-d01 (диапазон различных клеточных линий: HT29, НерG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780) после инкубации в течение 24 часов. Все конъюгаты дополнительно конъюгировали с NHS сложным эфиром ICC и значения корректировали флуоресценцией в зависимости от отличающегося отношения красителя к белку или содержания дендримера.

Соединение	% захвата
ICC-d01 (только дендримерный краситель)	100
ICC-IT-d01 (только дендримерный краситель)	85-100
ICC-d18 (только дендримерный краситель)	110-125
ICC-IT-d18 (только дендримерный краситель)	95-110
Sap (без дендримера)	5-8
Sap-d02	55-70
Дифтерийный токсин (без дендримера)	8-10

Dph-d02	45-68
L-аспарагиназа (без дендримера)	4-7
Asp-d02	85-95
ДНКаза (без дендримера)	4-12
ДНКаза-d02	50-65
IgG (без дендримера)	3-5
IgG-d02	30-45

Пример 16

Активность конъюгатов белок-дендример в опухолевых клетках

Для измерений цитотоксичности 2×10^5 клеток инкубировали с 1 мл культуральной среды, содержащей возрастающие концентрации исследуемых веществ. После обработки в течение 72 часов, количество клеток, эффективность и диаметр клеток как параметр процессов апоптоза анализировали посредством устройства для подсчета клеток и аналитической системы (CASY®, Schärfe Systems). Кроме того, цитотоксичность препаратов оценивали *in vitro* с использованием анализа МТТ (клеточное восстановление бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в качестве теста на метаболическую активность клеток. В 96-луночные планшеты высевали 1×10^4 клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды, содержащей возрастающие концентрации исследуемого вещества. В каждую лунку добавляли 10 мкл МТТ (5 мг/мл в PBS, полученные от компании Sigma) и планшеты инкубировали в течение 4 часов, 24 часов, 48 часов или до 72 часов. Полученный формазановый продукт растворяли кислым изопропанолом, и поглощение измеряли при длине волны 570 нм (Ex 570) посредством планшетного спектрофотометра (Anthos htII, Microsystems). В нескольких экспериментах среду с исследуемыми веществами удаляли через 48 часов, клетки подсчитывали, и идентичные количества клеток с новой средой без исследуемых веществ высевали в новые планшеты. Анализ МТТ проводили после дополнительной инкубации в течение 72 часов.

Например, в таблице 6 показано, что конъюгаты токсинов, ингибирующих рибосомы, демонстрируют повышенную цитотоксичность благодаря клеточному захвату и внутриклеточной активности.

Эффекты могут быть получены с использованием, например, соединений Sap-d02, Sap-d13 или Sap-d19. Подобные эффекты могут быть получены в различных линиях опухолевых клеток, таких как клетки опухоли толстой кишки HT29, клетки опухоли печени HepG2, клетки опухоли поджелудочной железы QGP-1, клетки эпидермоидной опухоли A431;

Таблица 6

Значения IC_{50} ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780.

Соединение	IC_{50}
Sap (без дендримера)	>1 мкМ
Sap-d02	2-5 нМ
Sap-d13	4-8 нМ
Дифтерийный токсин (без дендримера)	>0,5 нМ
Dph-d02	1-3 нМ
L-аспарагиназа (без дендримера)	>1,5 мкМ
Asp-d13	10-20
ДНКаза (без дендримера)	>2 мкМ
ДНКаза-d10	4-9 нМ

Пример 17

Активность конъюгатов пептида с дендримером в опухолевых клетках

Измерения клеточных культур проводили способом, описанным в примере 16. В таблице 7 показаны результаты для различных конъюгатов пептида с дендримером.

Таблица 7

Значения IC_{50} ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780.

Соединение	IC_{50}
------------	-----------

d02-P1	0,9-2,1 мкМ
P1 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P2	0,8-1,7 мкМ
d02-P3	0,6-1,2 мкМ
P3 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P4	0,4-1,1 мкМ
P4 (пептид без дендримера)	10 мкМ
d02-P5	0,8-2,0 мкМ
P5 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P6	1,2-2,3
P6 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P7	1,1-1,8 мкМ
P7 (пептид без дендримера)	>10 мкМ

Пример 18

Селективность внутриклеточного захвата дендримерных конъюгатов с белками: эффекты ингибиторов в отношении захвата конъюгата L-аспарагиназы Asp-d02 (пример 12a).

Исследования клеточного захвата, измеренного методом FACS, проводили способом, описанным в примере 13. Соединение Asp-d13 инкубировали при концентрации 10^{-7} М в опухолевых клетках QGP-1 в течение 3 часов и 6 часов. Инкубацию проводили в присутствии одного из двух следующих субстратов: (1) 0,1 мМ генистеин, ингибитор эндоцитозного захвата (Rejman et al., Mol. Ther. 2005, 12, 468-474) или (2), 50 мМ рифамицин, ингибитор захвата посредством белков-транспортеров органических анионов (OATP; Vi et al, Drug Metab Dispos. 2012. 40, 1085-92). Результаты показывают, что FACS-сигналы по отношению к Asp-d13 без ингибитора (определяется как 100%) снижаются в присутствии рифамицина до 37-40%, в то время как значительное снижение не может быть измерено в присутствии генистеина (80-85%), смотри данные в таблице 7. Для L-аспарагиназы, связанной с полиглицеринсульфатом (средняя молекулярная масса 12000 Да, используется в соответствии с WO2011/095311), может быть идентифицирован эндоцитоз благодаря ингибированию генистеином.

Относительные значения ингибирования захвата в клетки QGP-1 в присутствии рифамицина или генистеин.

Соединение	Время	Без ингибитора (%)	+генистеин (%)	+рифамицин (%)
Asp-d02	3 ч	100	81	58
Asp-d02	6 ч	100	95	53
Asp-полиглицерин сульфат	3 ч	100	50	76
Asp-полиглицерин сульфат	6 ч	100	55	72

Пример 19

Активность конъюгатов белка с дендримером в опухолевых клетках по сравнению с сульфатированным полимером

В этом примере, сапориновый конъюгат Sap-d02 (пример 11) сравнивали с аналогичным конъюгатом с использованием полиглицеринсульфата полимерной неуставленной природы с сопоставимой молекулярной массой (среднее значение при 6000 г/моль, синтезированным в соответствии с Groger et al, Bioconjugate Chem 2013, 24, 1507). Этот полимер функционализировали с линкерным малеимидо-PEG(4)-COOH-NHS сложным эфиром, описанным в примере 2а, и дополнительно очищали с помощью хроматографии на RP. Конъюгацию с сапорином осуществляли способом, описанным в примере 11. Сравнительные измерения цитотоксичности осуществляли в соответствии с примером 16 с получением значения IC₅₀ из теста МТТ в 4-х различных клеточных линиях (смотри таблицу 8).

Таблица 8

Значения IC₅₀ ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, MCF-7).

Соединение	IC ₅₀
------------	------------------

Sap (без дендримера)	>1 мкМ
Sap-d02	2-5 нМ
Sap-полиглицерин сульфат	38-45 нМ

Пример 20

Способы хемоселективной и сайт-специфической конъюгации дендримеров с белками с использованием N-концевого цистеина (цистеиновая метка)

Пример 20a

Дендримеры могут быть конъюгированы с терапевтическими средствами на основе антител и белков, а также синтетическими пептидами, когда эти полиаминокислоты предусмотрены с цистеиновой меткой, тем самым обеспечивая хемоселективную конъюгацию с цистеином с дендримерами, несущими малеимидо-, пиридинилдисульфид или другие тиол-селективные группы, известные специалисту в данной области (такие как бромацетил, винилсульфон).

Общий протокол для конъюгации белков (25-30 кДа) с цистеиновой меткой: 1 мл раствора белка (конц. 2 мг/мл) в PBS, содержащем 1 мМ ЭДТК, инкубировали с раствором TCEP в PBS (с выходом 1 мМ TCEP в смеси) в течение 3 ч при комнатной температуре, с последующим добавлением 2 моль-экв. малеимидо-содержащих или пиридинилдисульфид-содержащих сульфатированных дендримеров (например, d02-d05, d13-d15) и взаимодействием в течение еще 2 ч при комнатной температуре. Очистку осуществляли с помощью кассет для диализа Slide-A-Lyzer (сложный эфир целлюлозы, MWCO 10 кДа) в TBS с pH 7,4.

Пример 20b

Белки с N-концевым цистеином или цистеиновыми заменителями могут быть конденсированы с другими макромолекулами, используя фрагмент сложного тиоэфира, посредством процесса нативного химического лигирования (NCL) (Wong CT et al, Mol Biosyst. 2013, 9, 826-33). Неожиданно, но сульфатированные дендримеры могут быть синтезированы как сложные тиоэфиры и обеспечивать конъюгацию по типу NCL с белками с N-концевым цистеином.

Синтез сульфатированных дендримеров с группой сложного

тиоэфира: раствор сульфатированного дендримера с NHS сложным эфиром (d11, 10 мг) в ДМФ (1 мл) подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. Метилового эфира 3-тиопропионовой кислоты (Xiao et al, Bioorg Med Chem Lett 2013, 23, 6046-6051) в течение 24 ч при 40°C. После отменного осаждения в ДМФ/этилацетат и лиофилизации из дистиллированной воды, получали 11 мг продукта d2 в виде желтого твердого вещества.

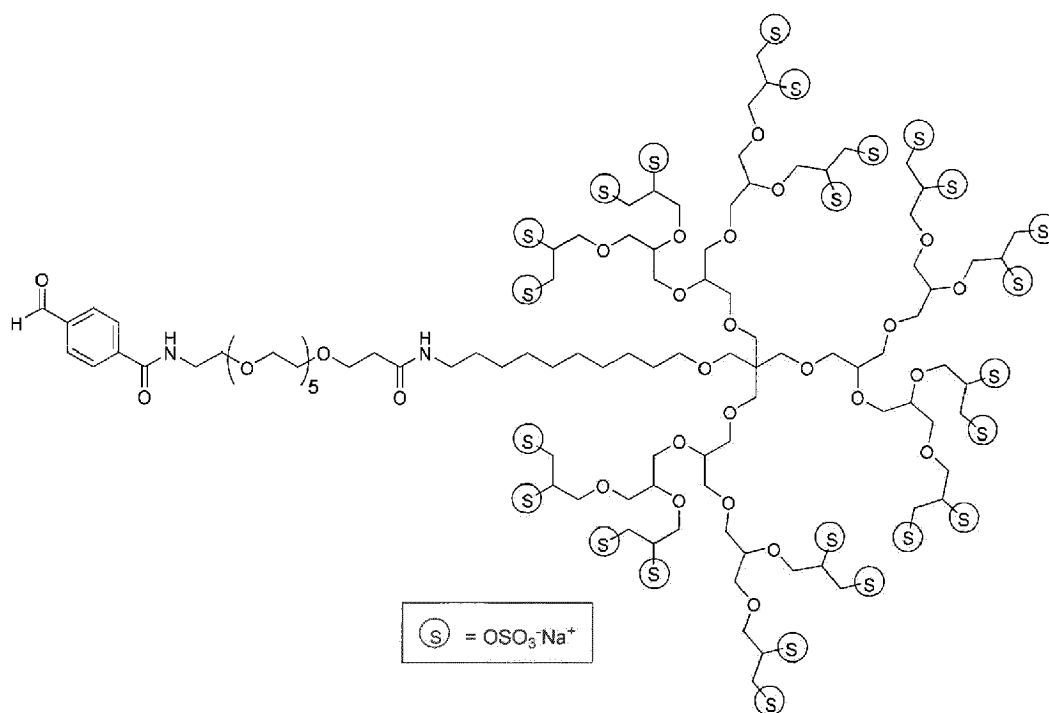
Общий протокол для конъюгации белков (25-30 кДа) с цистеиновой меткой: 1 мл раствора белка (конц. 2 мг/мл) в NCL-буфере, содержащем МРАА и ТСЕР в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7,0, инкубировали 2,5 моль-экв. дендримера d29 в течение 24 ч при комнатной температуре. Очистку осуществляли с помощью кассет для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 20 кДа) в PBS с pH 7,4. Продукт содержит свободный цистеин в соответствии с механизмом NCL и может быть дополнительно конъюгирован с флуоресцентным красителем (таким как ICC малеимид).

Пример 21

Хемоселективная конъюгация путем восстановительного аминирования с использованием сульфатированного дендримера с карбальдегидной группой

Пример 21a

Синтез сульфатированного дендримера **d31** с карбальдегидной группой



Азидо группу в дендримере **d06** (пример 2e) восстанавливали до амина с помощью ТСЕР. К раствору **d06** (50 мг, 0,01 ммоль 1) в 1 мл смеси вода/метанол (1:1) добавляли ТСЕР (20 мг, 0,067 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После упаривания, остаток подвергали диализу против 20% NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1000) с получением 45 мг (90%) соединения **d30** после лиофилизации (молекулярная масса 4631 г/моль). Модификацию с карбальдегидом осуществляли путем взаимодействия с N-гидроксисукцинимидильным эфиром 4-формилбензойной кислоты (Hooker, JM и др., Nano Letters 2007. 7, 2207-2210) в смеси ДМФ/вода с выходом сульфатированного дендримера **d31** в виде твердого осадка (молекулярная масса 4763 г/моль).

Пример 21b

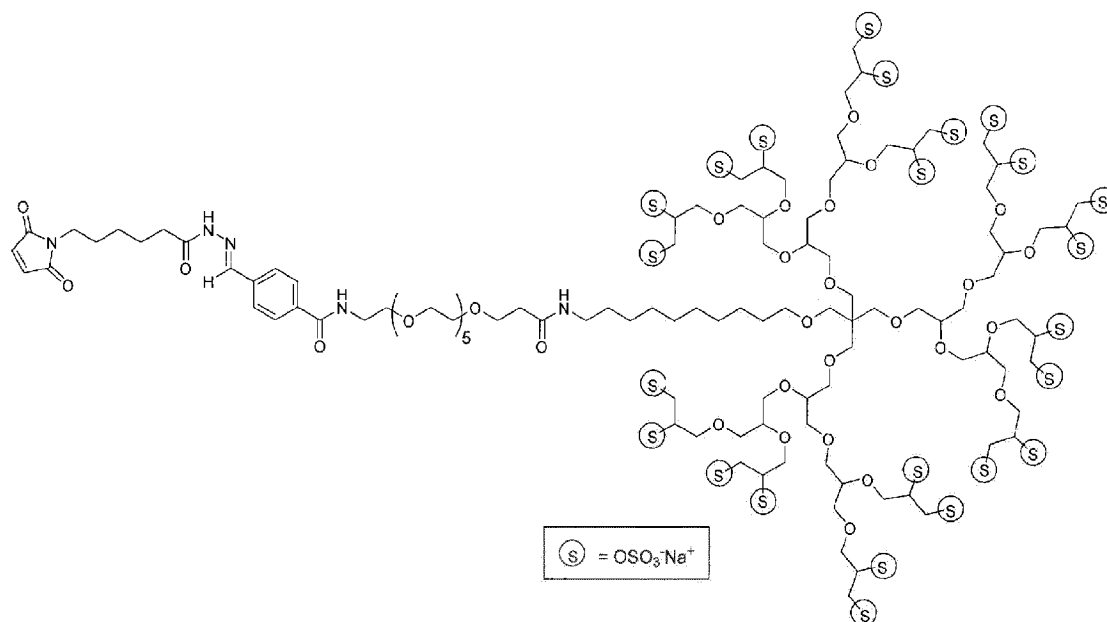
Хемоселективная конъюгация сульфатированных дендримеров **d31** с белками посредством восстановительного аминирования

Процесс осуществляли с белковыми растворами 2,5 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7,0. Общая процедура: раствор 1 мг белка (0,4 мл) и 3-моль экв. дендримера **d31** обрабатывали исходным раствором цианоборогидрида натрия (NaBH₃CN) в воде с получением конечной концентрации 1 мМ NaBH₃CN в смеси, который осторожно встряхивали в течение 48 ч при температуре 20°C.

Очистку осуществляли с помощью кассет для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 20 кДа) в TBS с pH 7,4. Дендримерную конъюгацию определяли методом гель-электрофореза с получением конверсии 50–70% белка в конъюгаты (отношение дендримера к белку неизвестно). Используемые белки представляли собой овальбумин, сапорин, дифтерийный токсин и неспецифический IgG. Очистку осуществляли с помощью SEC ВЭЖХ. Анализ отношения дендримера к белку осуществляли с помощью гель-электрофореза.

Пример 22

Конъюгация сульфатированного дендримера с белками посредством связи, расщепляемой кислотой: Синтез сульфатированного дендримера с гидразоновым линкером и малеимидо группой

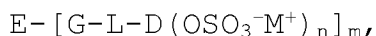


Дендример **d31** конденсировали с EMCH (гидразин ϵ -малеимидкапроновой кислоты) в соответствии с опубликованными способами (Walker GF et al.. Molecular Therapy 2005, 11, 418–425).

Эти типы модификации могут распространяться и на другие фрагменты ароматических алифатических альдегидов, а также кетонные фрагменты (такие как 4-ацетилбензойная кислота), с получением гидразонов, карбоксигидразинов, а также иминов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат формулы



где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу,

в которой $D(OSO_3^-M^+)_n$ представляет собой дендимер D, несущий сульфатные группы $OSO_3^-M^+$ в количестве n,

где количество n сульфатных групп выбрано из диапазона от 6 до 96,

где M представляет собой катионный неорганический или органический противоион к анионной сульфатной группе,

где L представляет собой линкер или спейсер между D и E,

где G представляет собой соединительную функциональную группу, образующую соединение между L и E,

и где m равно целому числу от 1 до 20.

2. Конъюгат по п.1, где каждый из дендимеров D указанного конъюгата имеет аналогичную молекулярную массу.

3. Конъюгат по п.1 или 2, где количество n сульфатных групп является одинаковым для каждого дендимера D.

4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где повторяющиеся звенья мономеров для построения дендритной структуры выбраны из группы, состоящей из 1,2-замещенного глицерина, 1,3-замещенного глицерина, пентаэритрита, глюкозы, маннозы, галактозы, лизина, трис (гидроксиметил) аминметана, трис (пропионовая кислота) аминметана, 1,1'-бис (гидроксиметил) пропионовой кислоты, янтарной кислоты, глутаровой кислоты, малеиновой кислоты, гликолевой кислоты, дигликолевой кислоты, адипиновой кислоты, молочной кислоты, лимонной кислоты, (2-аминоэтил) амида пропионовой кислоты, пропиленimina, этиленimina, пропиленоксида, этиленоксида.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, где связь указанных мономеров в дендимере D основана на функциональных группах, выбранных из простого эфира, тиоэфира, эфира карбоновой кислоты, эфира сульфониловой кислоты, сульфонамида, карбоксиламида, амина, карбамата, тиокарбамата, мочевины, тиомочевины, гидразона, имина, дисульфида, фосфата, фосфоната,

триазола, ацеталя и кеталя.

6. Конъюгат по пп.1-5, где D содержит концевые группы, выбранные из 1,2-дисульфатоалкила, 1,3-дисульфатоалкила, 1,2,4-трисульфато-3-алкила, N,N'-ди(1-сульфатоалкил) амина, трис(сульфатометил)метила и 1,2,3,4,5-пентасульфатоалкила.

7. Конъюгат по п.1, где L представляет собой C₄₋₁₀₀-алкильную группу, выбранную из группы, состоящей из алифатических циклических, разветвленных или линейных звеньев, в которых одна или несколько метиленовых групп могут независимо быть заменены звеном, выбранным из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O⁻M⁺)O, P(=O)(O⁻M⁺)O, арилена, этенилена или этинилена, и триазиолилена, в котором любой атом водорода может быть независимо заменен метилом, этилом или гидроксиметилом.

8. Конъюгат по п.1, где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу.

9. Конъюгат по п.8, где эффекторные молекулы выбраны из группы, состоящей из малых молекул, пептидов, белков, гликанов и нуклеиновых кислот.

10. Конъюгат по пп.8 или 9, где эффекторная молекула представляет собой терапевтическую эффекторную молекулу, содержащую вещества, которые могут нарушать внутриклеточные механизмы пролиферации, апоптоза, синтеза вещества соединительной ткани (например, коллагена, фибронектина), иммунитета, физиологического старения или иммунной защиты.

11. Конъюгат по п.9, где малая молекула выбрана из группы, состоящей из цитостатиков и пептидных или пептидомиметических структур, включая циклические или с открытой цепью пептиды с природными или неприродными структурными модификациями.

12. Конъюгат по п.9, где белки выбраны из группы, состоящей из глобулярных белков, гликопротеинов, токсинов, ферментов, антител, фрагментов антител, сконструированного антитела и белковых конструкций, включая однодоменные антитела (sdAb), одноцепочечные антитела на основе переменных фрагментов (scFv), антитела, содержащие одноцепочечный

вариабельный и константный фрагменты (ScFv-Fc).

13. Конъюгат по любому из пп. 8-12, где E направлен против молекул, участвующих в пролиферации и апоптозе опухолевых клеток.

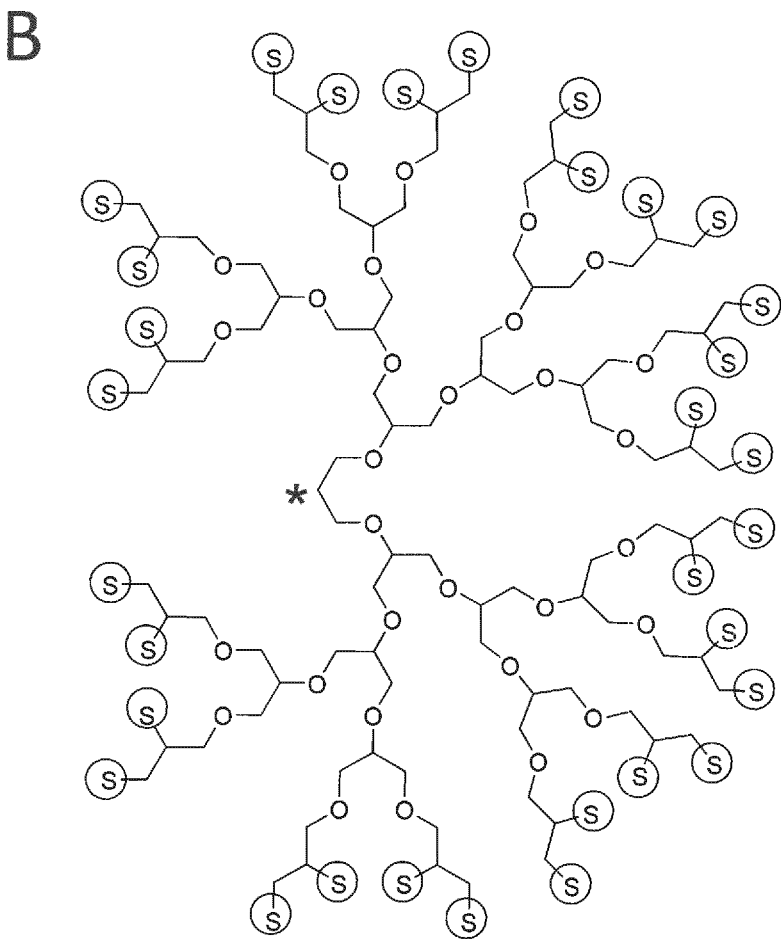
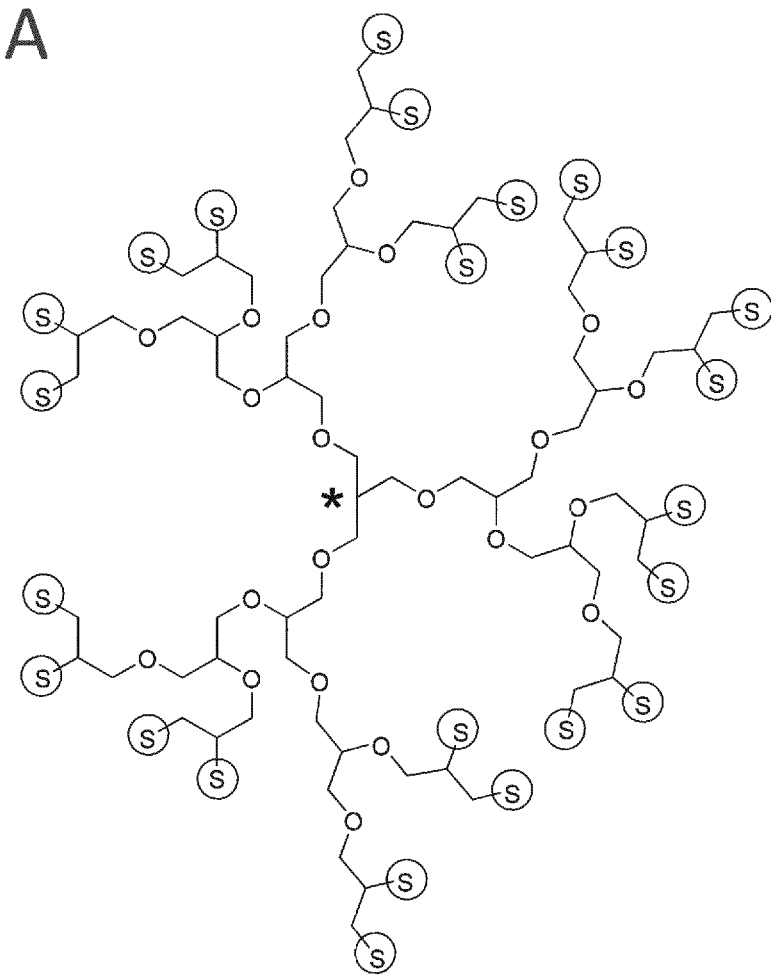
14. Конъюгат по п.1, где G представляет собой связывающую функциональную группу, образующую ковалентное присоединение между E и L, выбранную из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(-NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O₂)O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O⁻M⁺)O, P(=O)(O⁻M⁺)O, арилена, этенилена, этинилена и триазолилена.

15. Конъюгат по любому из пп.1-14 для применения (i) при лечении заболевания, выбранного из группы, включающей злокачественную опухоль, воспаление, аутоиммунное заболевание, метаболическое заболевание и фиброз, или (ii) в антипролиферативном, пропролиферативном, антиапоптическом, проапоптотическом, антифиброзном, профиброзном, антилипогенном, антидиабетическом, иммуностимулирующем и замедляющем старение лечении.

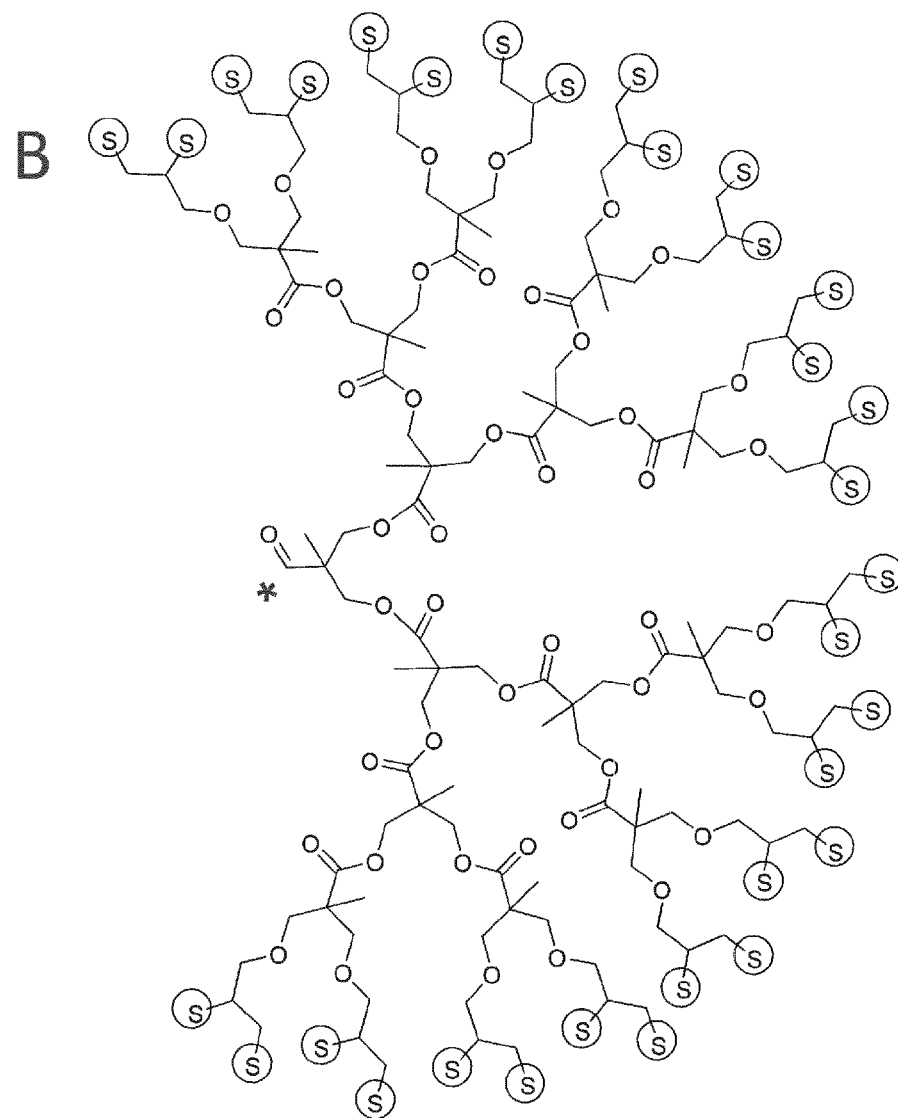
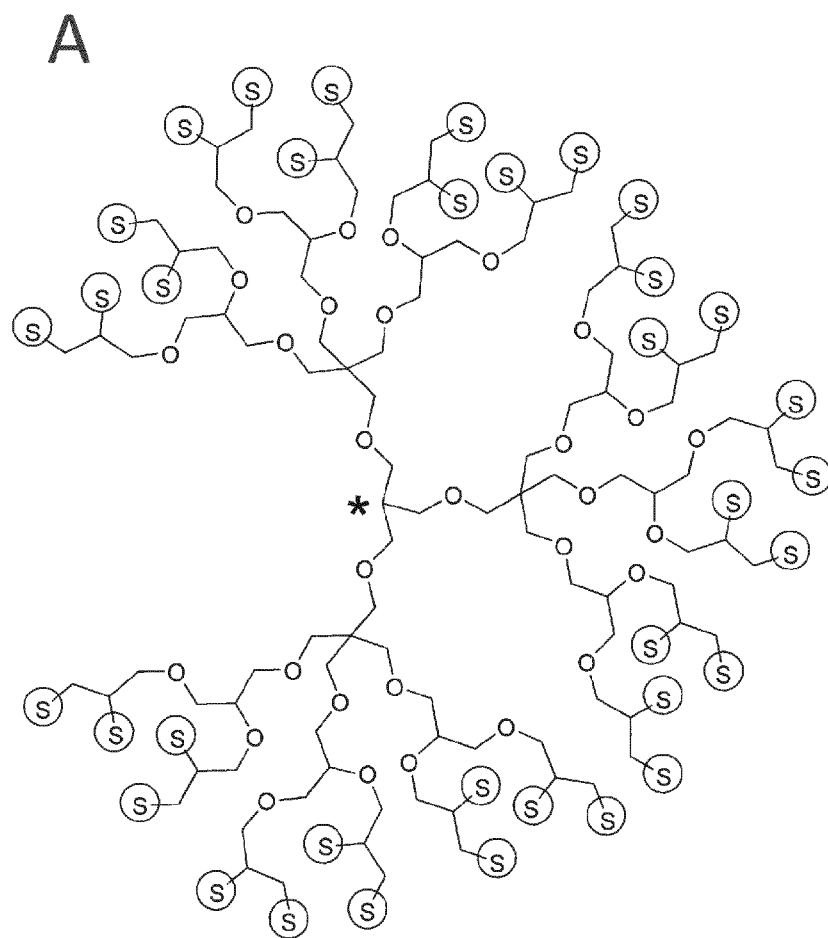
16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.1-15.

По доверенности

ФИГ. 1

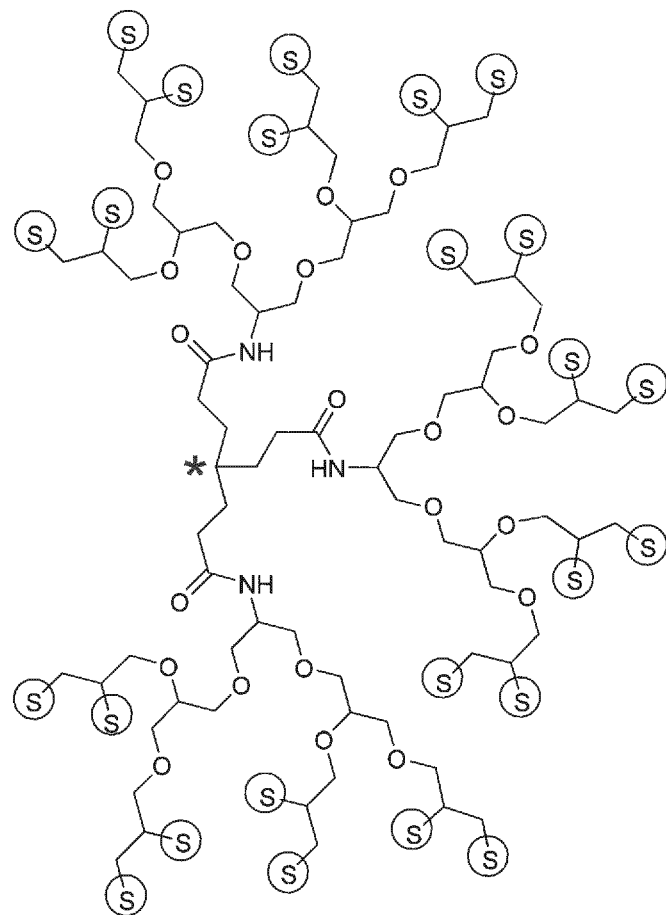


ФИГ. 2

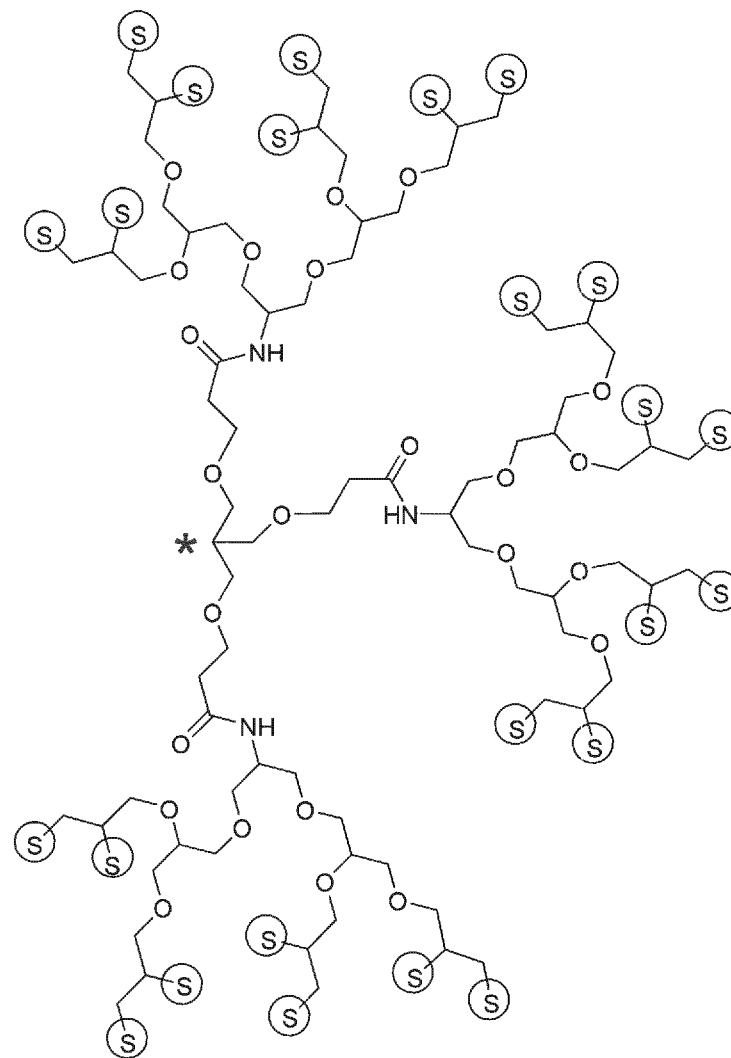


ФИГ. 3

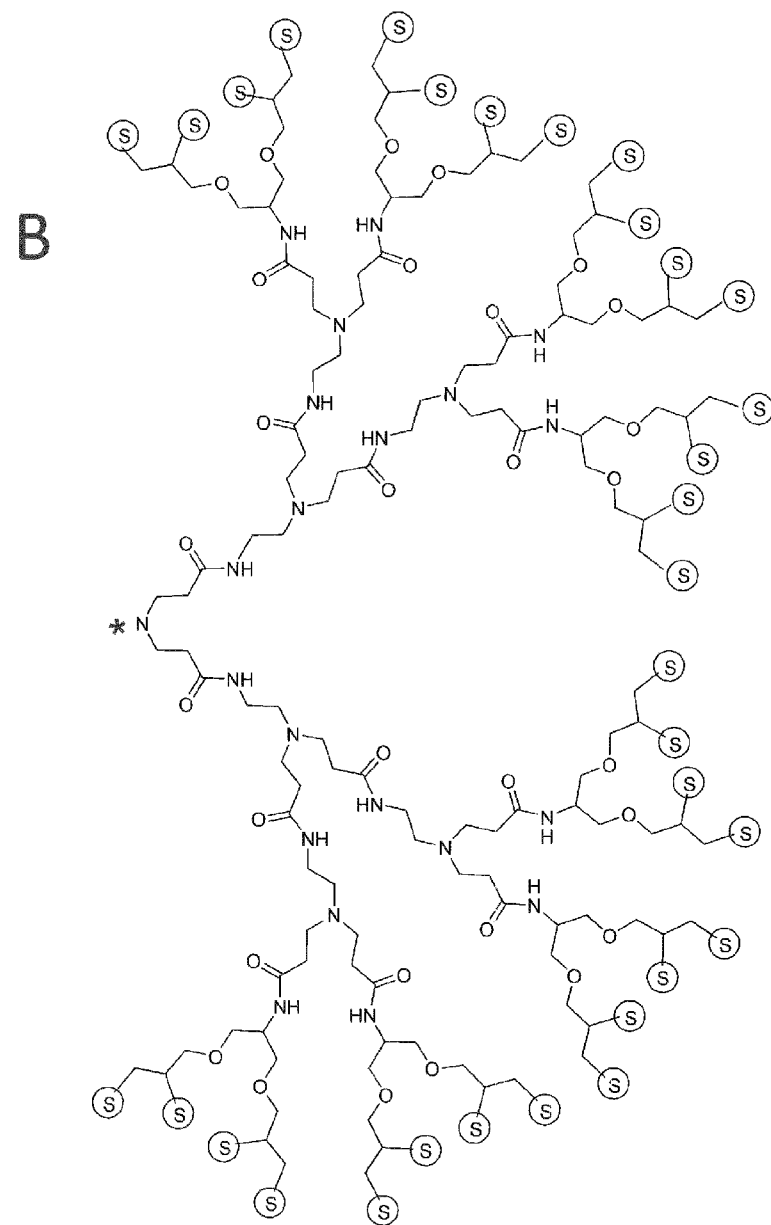
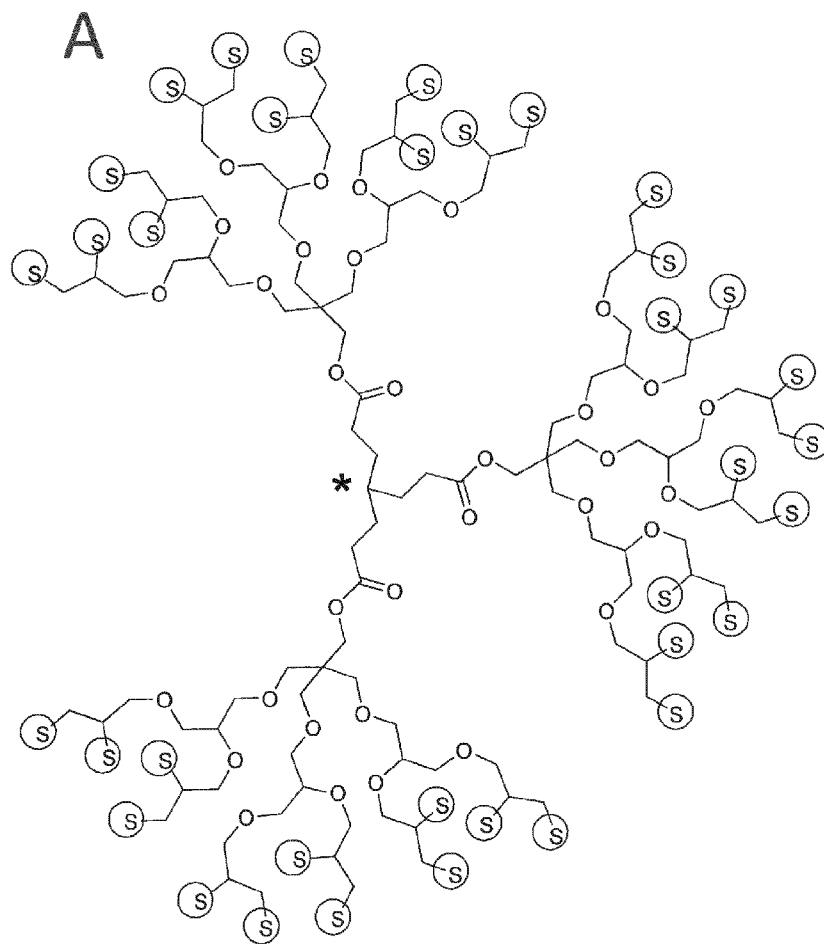
A



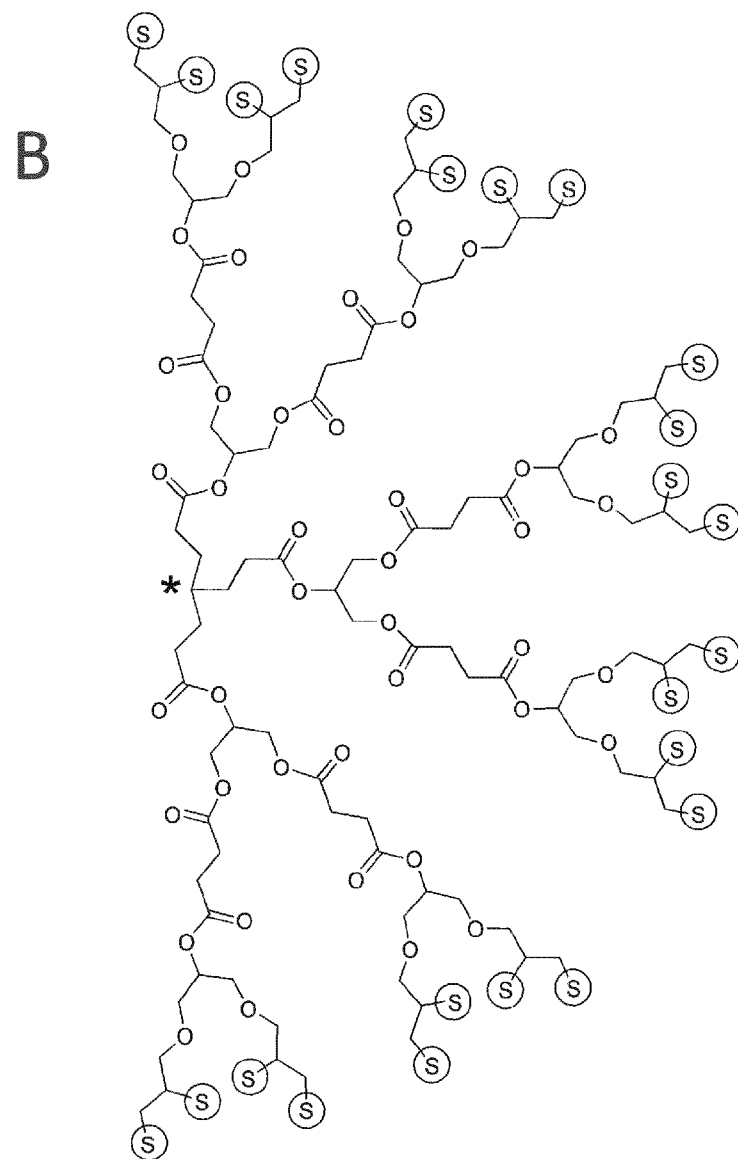
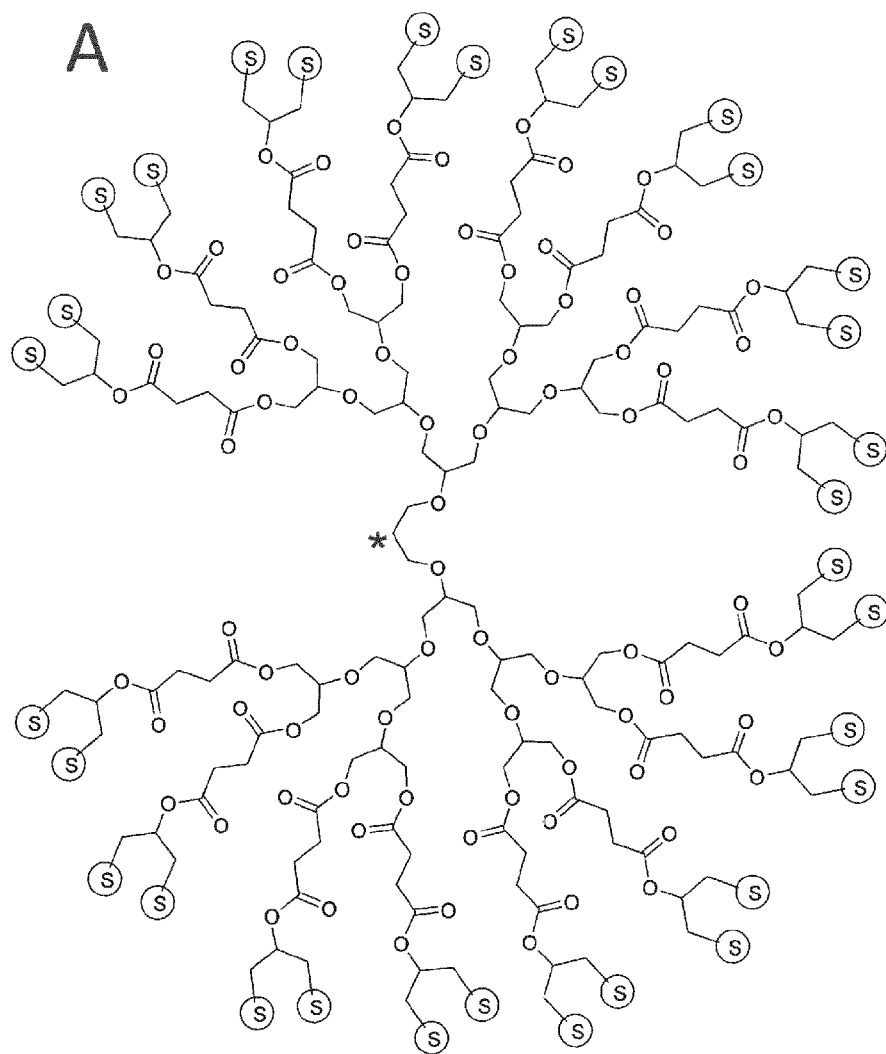
B



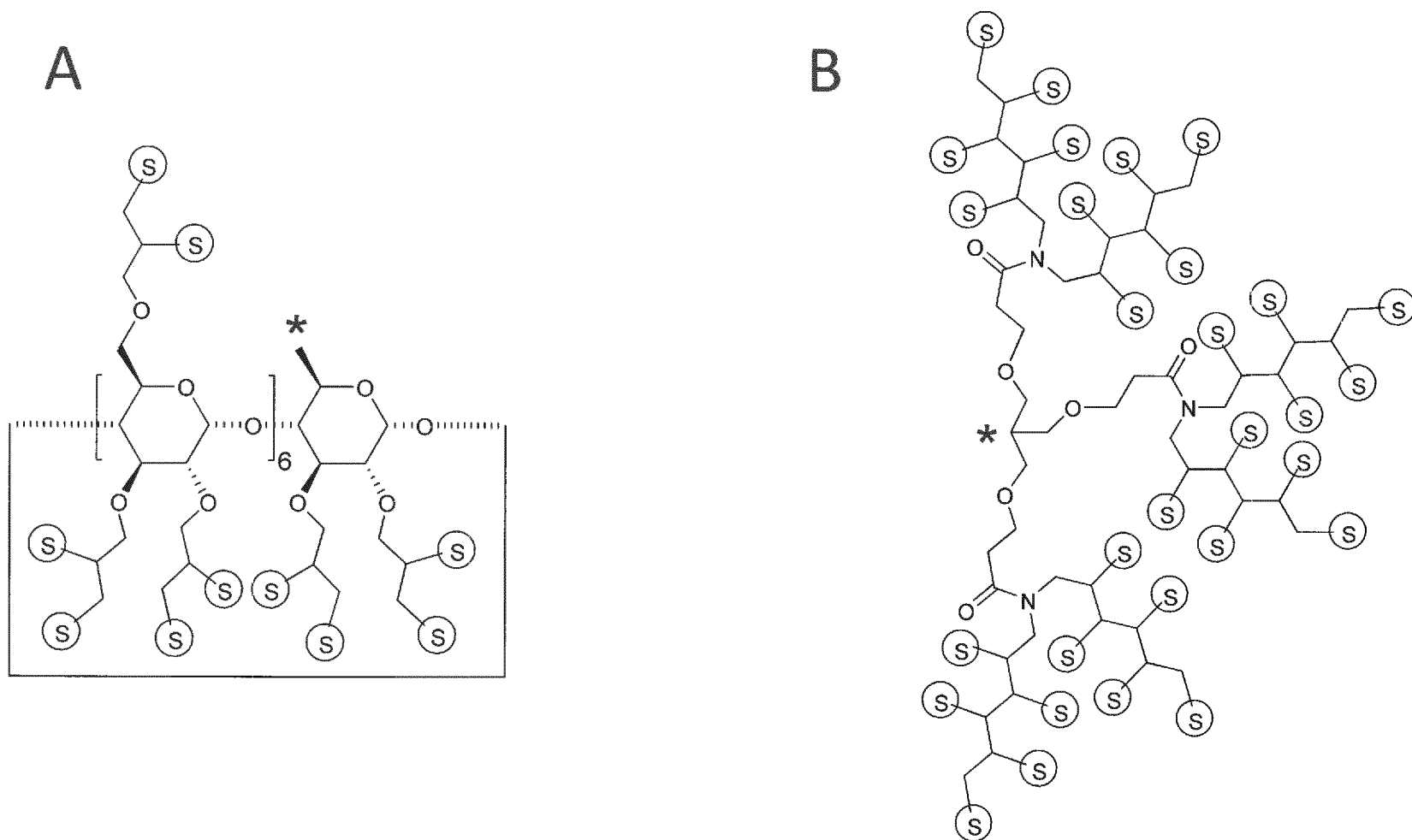
ФИГ. 4



ФИГ. 5

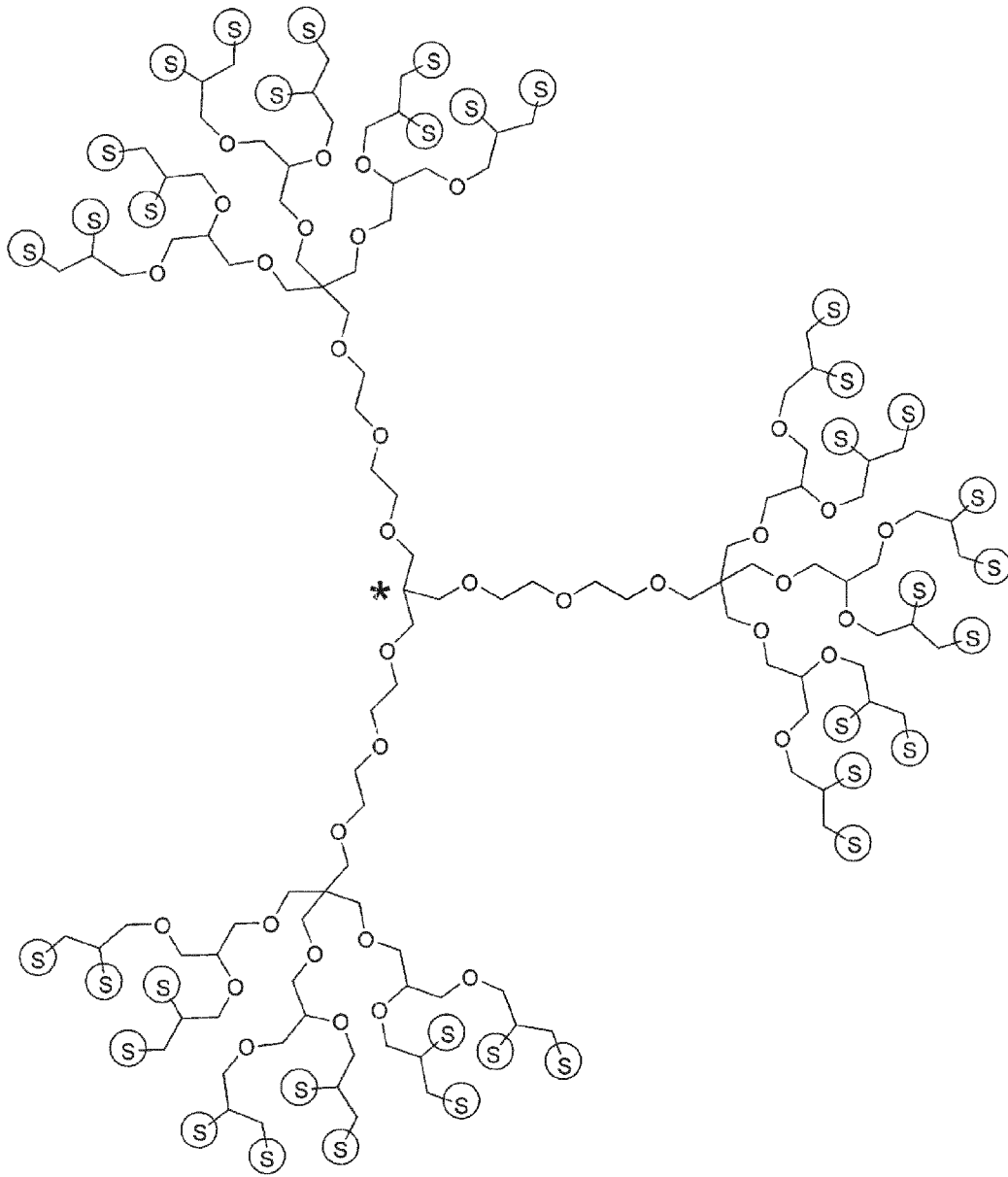


ФИГ. 6



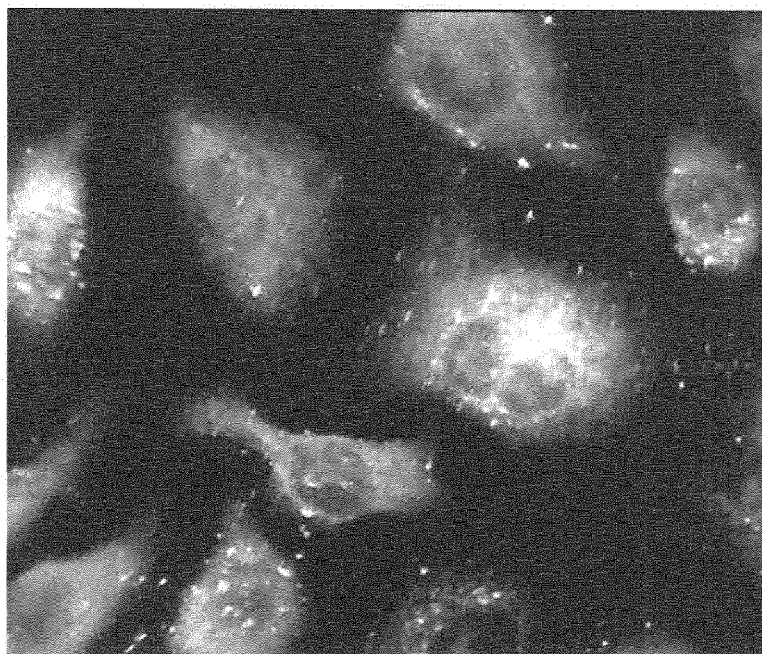
ФИГ. 7

A



ФИГ. 8

А



В

