

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034046**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.23

(21) Номер заявки
201590863

(22) Дата подачи заявки
2013.12.27

(51) Int. Cl. **A61K 45/06** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

**(54) ОЛИГОПЕПТИДНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА С ФОСФОНОАЦЕТИЛЬНОЙ
КЭПИРУЮЩЕЙ ГРУППОЙ**

(31) **61/746,621**

(32) **2012.12.28**

(33) **US**

(43) **2015.11.30**

(86) **PCT/EP2013/078034**

(87) **WO 2014/102312 2014.07.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КОБИОРЕС НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Труэ Андрэ (BE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A2-2008120098**

WO-A2-0033888

US-A1-2006281897

WO-A1-0238590

WO-A1-03064454

WO-A2-0071571

WO-A2-2008116053

WO-A2-2008142513

WO-A1-9529691

US-A1-2003138432

DANIEL GIGOT ET AL.: "New compounds: Peptide derivatives of the antitumor agent N-phosphonoacetyl-L-aspartic acid" **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES** vol. 73, no. 2 1 February 1984 (1984-02-01), page 275-277, XP055124353 ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.260073023 page 275; compound VIII page 276; compound XIII

WO-A1-9734927

(57) В изобретении предложены олигопептидные пролекарства с фосфоноацетильной кэпирующей группой, которые предназначены для лечения рака. В частности, предложено пролекарство или его фармацевтически приемлемая соль, при этом указанное пролекарство имеет общую структуру: $[C_x-OP]_y-D$, где C представляет собой кэпирующую фосфоноацетильную группу; OP представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6); D представляет собой противоопухолевое лекарственное средство; x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$; y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая указанное пролекарство, применение указанного пролекарства для лечения рака, способы получения указанного пролекарства, способ выбора пролекарства-кандидата и набор для направленной доставки в опухоль.

B1**034046****034046****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к области олигопептидных пролекарств с фосфоноацетильной эспирующей группой, которые предназначены для лечения рака. Селективность этих пролекарств требует присутствия (олиго)пептидного фрагмента и/или защитной эспирующей группы для обеспечения стабильности пролекарства в крови. Также настоящее изобретение, в частности, относится к отдельному олигопептидному фрагменту ALGP и содержащим его пролекарствам. В частности, настоящее изобретение также относится к эспирующей группе фосфоноацетил и пролекарствам, содержащим указанную эспирующую группу.

Уровень техники

Терапия рака на сегодняшний день остается одной из основных проблем медицины. Справиться с указанной проблемой позволит только комбинированный терапевтический подход. Он будет включать операцию, классическую хемотоксичную химиотерапию, молекулярно-нацеленные лекарственные средства и иммунотерапию.

Основной проблемой при использовании хемотоксических лекарственных средств является селективность в отношении раковых клеток, приводящая к ограничению дозы и угрожающим жизни токсическим побочным эффектам. Наиболее распространенной острой токсичностью является миелотоксичность, приводящая к тяжелой лейкопении и тромбоцитопении. Некоторые из наиболее часто используемых лекарственных средств также имеют более специфичную токсичность. Доксорубицин (Dox), антрациклиновое лекарственное средство является одним из 17 таких хемотоксических лекарственных средств, которое вызывает, помимо тяжелой миелотоксичности, тяжелую кардиотоксичность. Эти токсичности ограничивают его применение сверх суммарной дозы в 500 мг/м².

Подходами, используемыми для увеличения опухолеспецифичности препарата, являются конъюгирование с (i) распознающей опухоль молекулой (например, лигандом рецептора, см., например, Safavy et al. 1999 - J Med Chem 42,4919-4924) или с (ii) пептидом, который расщепляется преимущественно в непосредственной близости от опухолевых клеток посредством протеаз, преимущественно секретируемых или вырабатываемых опухолевыми клетками.

Разработаны опухолеспецифичные олигопептидные пролекарства, такие как пролекарства доксорубицина. В отличие от предыдущих исследований, эти пептидные пролекарства были разработаны таким образом, чтобы быть непроницаемыми для клеточных мембран, оставаться стабильными в крови при расщеплении до активного лекарственного средства посредством пептидаз, высвобождаемых во внеклеточное пространство солидных опухолей. Эти активирующие пептидазы необязательно являются опухолеспецифичными, но могут увеличить селективность лекарственного средства до той степени, что эти пептиды сверхсекретируются во внеклеточном пространстве солидных опухолей и играют важную роль в инвазии раковых клеток и метастазировании. Оригинальность этого подхода состоит в том, что он нацелен не на один хорошо известный фермент, а на всю ферментативную активность, которая, как обнаружено, обеспечивается веществами, экскретируемыми опухолевыми клетками человека, поддерживаемыми в культуре. В качестве пролекарства-кандидата был выбран N-сукцинил-бета-аланил-L-лейцил-L-аланил-L-лейцилдоксорубицин (Suc-βALAL-dox) (Fernandez et al. 2001, J Med Chem 44:3750-3). По сравнению с неконъюгированным доксорубицином данное пролекарство является менее токсичным примерно в 5 раз для мышей и примерно в 3 раза для собак. Было доказано, что хроническое лечение посредством Suc-βALAL-dox было значительно менее кардиотоксичным, чем лечение посредством Dox, при дозах, которые были до 8 раз выше (для крыс). Улучшенная активность Suc-βALAL-dox по сравнению с Dox наблюдалась в нескольких моделях на ксенотрансплантатах опухолей (Dubois et al. 2002, Cancer Res 62:2327-31; Ravel et al. 2008, Clin Cancer Res 14:1258-65). Позже, в среде, кондиционированной опухолевыми клетками, и в опухолевых клетках, были идентифицированы два фермента, CD10 (неприлизин, или кала-антиген) и тимет-олигопептидаза (TOP), которые являются активаторами Suc-βALAL-dox (Pan et al. 2003, Cancer Res 63:5526-31; Dubois et al. 2006, Eur J Cancer 42:3049-56), но в процесс активации также могут быть включены и другие неидентифицированные протеазы.

Клинические исследования Suc-βALAL-dox фазы I были инициированы биофармацевтической компанией DIATOS SA. Миелотоксичность возникала при дозах, в три раза более высоких по сравнению с Dox. О связанных с лекарственным средством тяжелых нежелательных сердечных явлениях не сообщалось, даже при очень высоких суммарных дозах (2750 мг/м²). Клиническая польза наблюдалась для 59% исследованных пациентов (Delord et al, неопубликовано).

Основное ограничение для Suc-βALAL-dox заключается в том, что в качестве существенного токсического эффекта остается лейкопения и что экспериментально более высокая противоопухолевая активность могла бы наблюдаться только за счет все еще существенной миелотоксичности. Полагают, что такая миелотоксичность возникает из-за чувствительности пептидного фрагмента Suc-βALAL-dox к гидролизу посредством ферментов, присутствующих в нормальных тканях.

В WO 02/100353 конкретно раскрыты химиотерапевтические пролекарства, разработанные таким образом, что они содержат олигопептид из 3-6 аминокислот, расщепляемый посредством CD10. В WO 02/00263 раскрыты пролекарства с олигопептидом из 3 аминокислот, расщепляемым посредством TOP и

по меньшей мере 1 пролекарство с аминокислотным олигопептидом (Leu-Ala-Gly), не расщепляемым посредством CD10. В WO 00/33888 и WO 01/95945 раскрыты пролекарства с олигопептидом из 4-20 аминокислот, содержащим не кодируемую генетически аминокислоту в фиксированном положении, где указанный олигопептид может расщепляться посредством TOP. В WO 01/95945 сообщается, что по меньшей мере 1 пролекарство с олигопептидом β Ala-Leu-Tyr-Leu является устойчивым к протеолитическому действию CD10. В WO 01/95943 раскрыты пролекарства с олигопептидом из 3-4 аминокислот, содержащим фиксированный изолейцин, где указанный олигопептид предпочтительно устойчив к TOP; при этом информация по чувствительности или устойчивости к CD10 не приведена. Более общая концепция пролекарства, состоящего из лекарственного средства, связанного с олигопептидом (из по меньшей мере 2 аминокислот), который связан с концевой группой, раскрыта в WO 96/05863 и далее была развита в WO 01/91798.

Другие конъюгаты полимерных лекарственных средств, в которых нелекарственный фрагмент содержит по меньшей мере водорастворимый полимер и пептид (содержащий 4-5 природных или неприродных аминокислот), селективно расщепляемые под действием матриксных металлопротеиназ (MMPs), раскрыты в WO 02/07770. Публикация WO 03/094972 сфокусирована на противоопухолевых пролекарствах, активируемых посредством белка активации фибробластов человека (FAP α); указанное пролекарство содержит олигопептид из 4-9 аминокислот с циклической аминокислотой в фиксированном положении. В WO 99/28345 раскрыто пролекарство, которые могут быть протеолитически расщеплены посредством простатспецифического антигена в олигопептиде из менее 10 аминокислот, присутствующем в пролекарстве.

В WO 97/34927 были обнаружены расщепляемые посредством FAP α пролекарства: Ala-Pro-7-амино-4-трифторметилкумарин и Lys-Pro-7-амино-4-трифторметилкумарин. Публикация WO 00/71571 сфокусирована на расщепляемых посредством FAP α пролекарствах, для которых были проведены некоторые дополнительные экспериментальные исследования в отношении протеолитической чувствительности к CD26 (дипептидилпептидаза IV), которая считается нежелательной ввиду относительного избытка CD26 также и в незлокачественных клетках.

Другие пролекарства, активируемые посредством FAP α , включают промеллитинотоксин (LeBeau et al. 2009, Mol Cancer Ther 8, 1378-1386), доксорубин (Huang et al. 2011, J Drug Target 19, 487-496), тапсигаргин (Brennen et al. 2012, J Natl Cancer Inst 104, 1320-1334) и пролекарства, содержащие олигопептид из 4-9 аминокислот с циклической аминокислотой в фиксированном положении (WO 03/094972).

В WO 01/68145 раскрыты расщепляемые посредством MMP, но устойчивые к неприлизину (CD10) пролекарства доксорубина (см. пример 1001 указанной публикации), содержащий олигопептид из 3-8 аминокислот. Разработаны чувствительные к металлопротеиназе и плазмину пролекарства доксорубина, а также конъюгаты CNGRC-пептида с доксорубином (Hu et al. 2010, Bioorg Med Chem Lett 20, 853-856; Chakravarty et al. 1983, J Med Chem 26, 638-644; Devy et al. 2004, FASEB J 18, 565-567; Vanhensbergen et al. 2002, Biochem Pharmacol 63, 897-908).

В WO97/12624, WO97/14416, WO98/10651, WO98/18493 и WO99/02175 раскрыты пептидсодержащие пролекарства, в которых пептид отщепляется посредством простатспецифического антигена (PSA).

Общим для всех приведенных выше пролекарств является наличие защитного или экранирующего фрагмента, как правило, ковалентно связанного с N-концевой стороной олигопептида, где указанный фрагмент повышает стабильность пролекарства и/или способствует предотвращению интернализации пролекарства в клетки, такие как клетки-мишени. Такие защитные или экранирующие фрагменты включают неприродные аминокислотные, β -аланильные или -сукцинильные группы (например, WO 96/05863, US 5,962,216). Другие стабилизирующие защитные или экранирующие фрагменты включают дигликолевую кислоту, малеиновую кислоту, пироглутаминовую кислоту, глутаровую кислоту (например, WO 00/33888), карбоновую кислоту, адипиновую кислоту, фталевую кислоту, фумаровую кислоту, нафталиндикарбоновую кислоту, 1,8-нафтилдикарбоновую кислоту, аконитовую кислоту, карбоксикоричную кислоту, триазолдикарбоновую кислоту, бутандисульфоновую кислоту, полиэтиленгликоль (PEG) или его аналоги (например, WO 01/95945), уксусную кислоту, 1- или 2-нафтилкарбоновую кислоту, глюконовую кислоту, 4-карбоксифенилбороновую кислоту, полиэтиленгликолевую кислоту, никотиновую кислоту и изоникотиновую кислоту (например, WO 02/00263, WO 02/100353), сукцинированный полиэтиленгликоль (например, WO 01/91798). Новый тип защитного или экранирующего фрагмента, представляющий собой 1,2,3,4-циклобутантетракарбоновую кислоту, введен в WO 2008/120098. Защитным или экранирующим фрагментом в WO 02/07770 может быть полиглутаминовая кислота, карбоксилированные декстраны, карбоксилированный полиэтиленгликоль или полимер на основе гидроксипролилметакриламида или N-(2-гидроксипролил)метакрилоамида.

Краткое описание изобретения

Пролекарства согласно настоящему изобретению имеют общую структуру: $[C_x-OP]_y-D$, где C представляет собой экранирующую группу, при этом указанная экранирующая группа C представляет собой фосфоацетильную группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой противоопухолевое лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и

причем связь между C и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

при этом, если y больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, и при этом по меньшей мере 1 ОР содержит эпирующую группу C;

или его фармацевтически приемлемая соль.

В частности, олигопептидный фрагмент в вышеуказанной структуре представляет собой тетрапептидный фрагмент, имеющий последовательность Ala-Leu-Gly-Pro (3-буквенный код), также обозначенную как ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO:1); и/или эпирующая группа C в вышеуказанной структуре представляет собой фосфоацетильную группу, и/или лекарственное средство в вышеуказанной структуре представляет собой доксорубин (далее также обозначенный как DOX или Dox). В качестве альтернативы, структура тетрапептида представляет собой TSGP (SEQ ID NO:4) или KLGP (SEQ ID NO:6). Соответственно, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения структура тетрапептида в вышеуказанной общей структуре выбрана из группы, состоящей из ALGP (SEQ ID NO:1), TSGP (SEQ ID NO:4), KLGP (SEQ ID NO:6). В частности, тетрапептид в указанной выше структуре выбран из ALGP (SEQ ID NO:1) или KLGP (SEQ ID NO:6); в еще более частном варианте тетрапептид в указанной выше структуре представляет собой ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO:1). В случае наличия указанный линкер или спейсерная группа в вышеуказанных пролекарствах или их солях может представлять собой самоустраняющийся линкер или спейсерную группу.

Фармацевтически приемлемые соли вышеуказанного(ых) пролекарства(пролекарств) также являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим одно из вышеуказанных пролекарств или их солей, или их комбинацию, и по меньшей мере один из растворителя, разбавителя или носителя.

Настоящее изобретение включает вышеуказанное пролекарство или его соль, или вышеуказанную композицию, содержащую пролекарство или его соль, для применения для лечения рака. Способы лечения рака также являются частью настоящего изобретения, и указанные способы включают введение субъекту, имеющему рак, указанного пролекарства, или его соли, или указанной композиции, причем указанное введение приводит к лечению указанного рака. В частности, эффективные количества указанного пролекарства, или его соли, или указанной фармацевтической композиции не вызывают тяжелой лейкопении или токсичности для сердца.

В частности, предложено пролекарство, имеющее общую структуру: $[C_x-OP]_y-D$,

где C представляет собой эпирующую группу, при этом указанная эпирующая группа C представляет собой фосфоацетильную группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и причем связь между C и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

при этом если y больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, и при этом по меньшей мере 1 ОР содержит эпирующую группу C; или его фармацевтически приемлемая соль,

причем указанное пролекарство предназначено для высвобождения лекарственного средства D в непосредственной близости к опухоли или опухоль-ассоциированным клеткам.

Способы получения вышеуказанных пролекарств являются частью настоящего изобретения, и указанные способы включают стадии:

(i) обеспечения лекарственного средства;

(ii) связывания указанного лекарственного средства с эпированным олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; и

(iii) очистки указанного пролекарства, полученного на стадии (ii);

где указанный олигопептидный фрагмент представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6), или

(i) обеспечения лекарственного средства;

(ii) связывания указанного лекарственного средства с олигопептидным фрагментом с последующим связыванием эспирующей группы с олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; и

(iii) очистки пролекарства, полученного на стадии (ii);

где указанный олигопептидный фрагмент представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6).

Настоящее изобретение также включает способы получения и скрининга (выбора) пролекарств-кандидатов, таких как пролекарства-кандидаты, имеющие общую структуру: [C_x-OP]y-D,

где С представляет собой эспирующую группу, при этом указанная эспирующая группа С представляет собой фосфоацетильную группу;

OP представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y = 1;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и

причем связь между С и OP и связь между OP и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

при этом если y больше 1, множество фрагментов OP индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, причём по меньшей мере 1 OP содержит эспирующую группу С; где указанный способ включает стадии:

(i) обеспечения лекарственного средства D;

(ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с [C_x-OP]y с получением пролекарства [C_x-OP]y-D;

(iii) приведения каждого из лекарственного средства D и указанного пролекарства [C_x-OP]y-D, независимо в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками;

(iv) определения цитотоксичности лекарственного средства D и указанного пролекарства [C_x-OP]y-D;

(v) идентификации по данным (iv) пролекарства [C_x-OP]y-D с цитотоксической активностью, сопоставимой с цитотоксической активностью лекарственного средства D; и

(vi) выбора пролекарства [C_x-OP]y-D, идентифицированного на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В любом из вышеуказанных способов скрининга указанное лекарственное средство D может быть выбрано из группы, состоящей из майтансина, гелданамицина, паклитаксела, доцетаксела, камптотецина, винбластина, винкристина, виндезина, метотрексата, аминоптерина, амрубицина или производного любого из них.

В соответствии с настоящим изобретением указанное лекарственное средство D может быть выбрано из группы, включающей доксорубин, даунорубин, амрубин, винбластин, винкрисин, калихеамицин, этопозид, этопозид фосфат, CC-1065, дуокармицин, KW 20 2189, метотрексат, метоптерин, аминоптерин, дихлорметотрексат, доцетаксел, паклитаксел, эпотилон, комбретастатин, комбретастатин A4 фосфат, доластатин 10, доластатин 11, доластатин 15, топотекан, камптотецин, митомицин С, порфирамицин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, флударабин, тамоксифен, цитозинарабинозид, аденозин-арабинозид, колхицин, галихондрин В, цисплатин, карбоплатин, митомицин С, блеомицин, мелфалан, хлорохин, циклоспорин А или майтансин.

В вышеуказанных способах и в случае наличия указанные линкер или спейсерная группа могут представлять собой самоустраниющиеся линкер или спейскрную группу.

Настоящее изобретение также относится к наборам, например, для направленной доставки в опухоль, содержащим емкость, содержащую вышеописанное пролекарство или его соль или содержащую композицию, содержащую такое пролекарство или его соль.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Влияние конъюгатов PhAc-пептид-Dox на массу тела нормальных мышей OF-1 (n=4). Лекарственные средства или контроли вводили внутривенным (в.в.) путем в 0-й день. Мыши получали постоянный объем (10 мкл/г) либо физиологического раствора (-●-), либо различных дозированных растворов: PhAc-ALAL-Dox 80 мкмоль/кг (-▲-) и 160 мкмоль/кг (-x-); PhAc-ALGP-Dox в количестве 240 мкмоль/кг (*) и 320 мкмоль/кг (-o-). Результаты представлены в виде изменения средней массы тела.

Фиг. 2. Исследование эффективности PhAc-ALGP-Dox в сравнении со свободным доксорубином на бестимусных мышцах NMRI с ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки человека LS174T. Лекарственные средства или контроли вводили в.в. путем в 0-й день и на 7-й день. Мыши получали постоянный объем (10 мкл/г) либо физиологического раствора (-●-; -o-), либо различных дозированных растворов: PhAc-ALGP-Dox 140 мкмоль/кг (-▲-) и 160 мкмоль/кг (-x-); Dox 15 мкмоль/кг (-◆-). Результаты представлены в виде изменения средней массы тела и объема опухоли ± стандартную ошибку среднего (SEM) (n=4).

Фиг. 3. Исследование эффективности PhAc-ALGP-Dox в сравнении со свободным доксорубицином на бестимусных мышах NMRI с ксенотрансплантатами MX-1 карциномы молочной железы человека. Лекарственные средства или контроли вводили в.в. путем в 0-й, 3-й, 6-й и 9-й дни. Мыши получали постоянный объем (10 мкл/г) либо физиологического раствора (-●-), либо различных дозированных растворов: PhAc-ALGP-Dox 100 мкмоль/кг (*); и Dox 8 мкмоль/кг (-■-). Результаты представлены в виде изменения средней массы тела и объема опухоли $\pm$ SEM (n=4).

Фиг. 4. Оценка времени для концентраций в плазме (A, B) и концентрации в сердечной ткани (C, D) доксорубицина или PhAc-ALGP-Dox и его метаболитов после в.в. болюсной инъекции самкам мышей OF-1 дикого типа в дозе 86,2 мкмоль/кг. Результаты представлены в виде средней концентрации $\pm$ стандартное отклонение (SD) (n=3).

Фиг. 5. Токсичность PhAc-ALGP-Dox и доксорубицина для клеток *in vitro* в отношении клеток Cor.At® (кардиомиоциты, полученные из эмбриональных стволовых клеток мыши). В качестве неспецифического контроля проводили также тест на инактивированных фибробластах эмбрионов мышей (MEF). Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии лекарственных средств, и проводили тест со связыванием нейтрального красного для определения жизнеспособности клеток. Результаты представлены в виде кривых цитотоксичности. Значения IC₅₀ рассчитывали по кривым цитотоксичности с применением программного обеспечения Prism GraphPad 5.0.

Фиг. 6. PhAc-ALGP-Dox вводили в увеличивающихся концентрациях (15, 35, 50, 100, 200, 300, 460, 620 мкмоль/кг) путем внутривенной инъекции бестимусным мышам NMRI с ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки LoVo (3 мыши на группу). Через 24 ч мышей умерщвляли, и собирали опухоли. Концентрации доксорубицина в опухолях определяли путем анализа посредством ВЭЖХ после экстракции. Результаты представлены в виде средней концентрации доксорубицина в опухоли (пмоль/мг белка) $\pm$ SD.

Фиг. 7. Исследование токсичности PhAc-ALGP-Dox после одной и множества внутрибрюшинных (в.б.) инъекций на мышах OF-1. Животных лечили посредством PhAc-ALGP-Dox различных схем лечения: в количестве 56 мкмоль/кг 5 $\times$ (Q1D5 -*-); в количестве 28 мкмоль/кг 10 $\times$ (2Q1D5 -■-); в количестве 560 мкмоль/кг 1 $\times$ (-ЖЖЖ-); в количестве 112 мкмоль/кг 5 $\times$ (Q1D5 -▲-); в количестве 56 мкмоль/кг 10 $\times$ (2Q1D5 -x-).

Фиг. 8. Изменение во времени концентрации PhAc-ALGP-Dox и его метаболитов (A) или доксорубицина (B) после внутрибрюшинной инъекции самкам мышей OF-1 дикого типа при эквивалентной дозе 92 мкмоль/кг. Результаты представлены в виде средней концентрации $\pm$ SD (n=3).

Фиг. 9. Исследование эффективности PhAc-ALGP-Dox в сравнении со свободным доксорубицином на бестимусных мышах NMRI с ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки человека LoVo. Лекарственные средства или контроли вводили в.б. путем дважды в день в течение пяти последовательных дней (стрелки). Мыши получали постоянный объем (10 мкл/г) либо физиологического раствора (-●-), либо различных дозированных растворов: PhAc-ALGP-Dox 25 мкмоль/кг (*), 35 мкмоль/кг (°) и 50 мкмоль/кг (+); Dox 0,5 мкмоль/кг (■), 1 мкмоль/кг (▲) и 2 мкмоль/кг (x). Результаты отражают изменение средней массы тела и объема опухоли $\pm$ SEM (n=4). ** Статистическое отличие с p<0,05 от Dox 2 мкмоль/кг (t-критерий Манна-Уитни, программное обеспечение Graph Pad Prism 5.0).

Фиг. 10. Исследование эффективности PhAc-ALGP-Dox в сравнении со свободным доксорубицином на бестимусных мышах NMRI с ксенотрансплантатами карциномы молочной железы человека MX-1. Лекарственные средства или контроли вводили в.б. путем дважды в день в течение пяти последовательных дней (стрелки). Лечение повторяли с 72-часовым интервалом между двумя циклами. Мыши получали постоянный объем (10 мкл/г) либо физиологического раствора (●), либо различных дозированных растворов: PhAc-ALGP-Dox 50 мкмоль/кг (°), Dox 1 мкмоль/кг (■) и 1.5 мкмоль/кг (▲). Результаты отражают изменение средней массы тела и объема опухоли $\pm$ SEM (n=6). † = умершая мышь.

Фиг. 11. Оценка эффективности PhAc-ALGP-Dox в сравнении с доксорубицином на модели легочной метастазирующей меланомы B16-F10. На графике слева представлены количества меланина в метастазах легких на 14-й день после инъекции опухолевых клеток B16F10. На графике справа приведены кривые выживаемости.

Фиг. 12. Оценка лейкопенического эффекта PhAc-ALGP-Dox в сравнении с доксорубицином. Мыши CD1 дважды в день получали внутрибрюшинные инъекции PhAc-ALGP-Dox 35 мкмоль/кг (●) или доксорубицина 3,5 мкмоль/кг (■) в течение пяти последовательных дней. Записывали изменение массы тела мышей (A). Собирали кровь из хвостовой вены в пробирки Microvettes с гепарином (Starsted) на 4-й, 11-й и 15-й дни после начала лечения. Проводили подсчет периферических белых кровяных телец (WBC) с использованием гематологического анализатора SCILvet abc (B). Увеличение или уменьшение WBC выражали в виде процента по отношению к WBC в 0-й день (100 %) для каждой мыши. На кривых приведено изменение средних процентных значений.

Фиг. 13. Оценка хронической кардиотоксичности PhAc-ALGP-Dox на мышах CD-1. Животные получали 10 внутривенных инъекций (стрелки) физиологического раствора (●); доксорубицина 6,9 мкмоль/кг (■) или PhAc-ALGP-Dox в количестве 13,8 (▲), 27,6 (x), 55,2 (*) и 82,8 мкмоль/кг (°). Резуль-

таты представлены в виде изменения средней относительной массы тела (%). †= умершая мышь.

Фиг. 14. Оценка противоопухолевого действия PhAc-ALGP-dox на мышах SCID с ортотопическими опухолями толстой кишки человека HCT116. Мышам SCID вводили ортотопически (в слепую кишку) клетки опухоли толстой кишки человека HCT116. Одну группу лечили физиологическим раствором, а группы 2 и 3 получали 10 внутривентральных инъекций (2Q1D5) по 35 и 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-доксорубина. Массу первичных опухолей записывали на 34-й день после инокуляции клеток.

Фиг. 15. Оценка антиметастатического эффекта (в печени) PhAc-ALGP-dox на мышах SCID с ортотопическими опухолями толстой кишки человека HCT116. Мышам SCID вводили ортотопически (в слепую кишку) опухолевые клетки толстой кишки человека HCT116. Одну группу лечили солевым раствором, а группы 2 и 3 получали 10 внутривентральных инъекций (2Q1D5) по 35 и 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-доксорубина. Записывали данные по метастазам в печени на 34-й день после инокуляции клеток.

Фиг. 16. Действие PhAc-ALGP на модели с ксенотрансплантатом UZLX-STS3. UZLX-STS3 представляет собой ксенотрансплантат ткани, полученной у пациента, которому поставлен диагноз дифференцированная липосаркома (DDLPS). В процессе выполнения пассажей, в опухолях, выделенных из мышей, обнаружили те же морфологические и молекулярные признаки, что и в исходной биопсии, взятой у пациента при хирургической операции (то есть амплификация гена MDM2, иммуноположительные клетки в отношении MDM2). В предыдущих ксенотрансплантатах, не полученных путем перфузии, данная опухолевая модель саркомы была совершенно устойчива к свободному доксорубину, который давали в его максимально переносимой дозе.

Мышам в общем количестве 24 штуки билатерально трансплантировали UZLX-STS3 (ксенотрансплантаты ткани, пассаж 10). Животных случайным образом распределяли на три различные группы: контрольную группу (физиологический раствор; -●-); группу PhAc-ALGP-доксорубина (суммарная доза 1,20 ммоль/кг; -■-) и группу доксорубина (суммарная доза 0,03 ммоль/кг; -▲-). Лекарственные средства вводили внутривентрально в течение 7 дней путем непрерывного высвобождения через осмотический насос Alzet® при скорости доставки 0,5 мл/ч в течение 7 дней. Эксперимент продолжали 21 день (7 дней лечения + 14 дней наблюдения). Оценивали объем опухоли и массу тела мыши на исходном уровне и далее три раза в неделю до конца каждого эксперимента. Через 21 день мышей умерщвляли. Объем опухоли записывали 3 раза в неделю путем измерения посредством 3-мерного штангенциркуля. Данные представлены в виде среднего из относительных объемов опухолей на группу ± стандартное отклонение.

Сравнение объемов опухоли на нулевой день и объемов на последний день экспериментов проводили посредством парного критерия соответствия Вилкоксона. Сравнения между различными группами проводили с использованием критерия Манна-Уитни (относительные объемы опухолей, гистологическая оценка). $P < 0,05$ считали статистически значимым. Для всех расчетов использовали программное обеспечение STATISTICA (StatSoft, версия 12.0).

Фиг. 17. Изменение относительной массы тела животных в эксперименте приведено на фиг. 16. Данные представлены в виде средней относительной массы тела мышей в каждой группе ± стандартное отклонение. Пунктирные линии обозначают значения сравнения для линии мышей nu/nu NMRI. PhAc-ALGP-доксорубин (-■-); Dox (-▲-) и физиологический раствор (-●-).

Фиг. 18. Изменение общего количества белых кровяных телец ($10^3/\text{мкл}$) у животных в эксперименте приведено на фиг. 16. Данные представлены в виде среднего количества белых кровяных телец у мышей в каждой группе ± стандартное отклонение. Пунктирные линии обозначают значения сравнения для линии мышей nu/nu NMRI. PhAc-ALGP-доксорубин (-■-); Dox (-▲-) и физиологический раствор (-●-). Общее количество белых кровяных телец определяли с использованием мультипараметрического автоматизированного гематологического анализатора CELL-DYN 3500 с оптимизацией по параметрам крови мышей (Abott Diagnostics, Division, IL, США).

Фиг. 19. Изменение общего количества нейтрофилов ($10^3/\text{мкл}$) у животных в эксперименте приведено на фиг. 16. Данные представлены в виде среднего количества нейтрофилов у мышей в каждой группе ± стандартное отклонение. Пунктирные линии обозначают значения сравнения для линии мышей nu/nu NMRI. PhAc-ALGP-доксорубин (-■-); Dox (-▲-) и физиологический раствор (-●-). Количество нейтрофилов определяли с использованием мультипараметрического автоматизированного гематологического анализатора CELL-DYN 3500 с оптимизацией по параметрам крови мышей (Abort Diagnostics, Division, IL, США).

Подробное описание изобретения

В целом, в настоящем изобретении описаны новые пролекарственные соединения терапевтических агентов, в частности пролекарства, содержащие противоопухолевый терапевтический агент, демонстрирующие улучшенные терапевтические свойства. Указанные улучшенные терапевтические свойства включают в себя сниженную токсичность и повышенную эффективность. В частности, указанные пролекарства демонстрируют высокую специфичность действия, сниженную токсичность, улучшенную стабильность в сыворотке и крови, и соответствующий терапевтический агент не перемещается в клетки-мишени, пока пролекарство не будет окончательно активировано (активация может включать в себя не-

сколько стадий) посредством (а) связанного(ых) с клетками-мишенями фермента(ов), таких как внеклеточные пептидазы, высвобождающиеся из клеток-мишеней, или таких ферментов, которые связаны с внеклеточной поверхностью клеток-мишеней. Целевые клетки включают раковые клетки, а также стромальные опухолевые клетки. Пролекарственные соединения согласно настоящему изобретению представляют собой пролекарства терапевтического агента, в которых терапевтический агент непосредственно или опосредованно связан с олигопептидом, который, в свою очередь, связан со стабилизирующей кэпирующей группой.

В общем, пролекарства согласно настоящему изобретению имеют следующую общую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу;

ОР представляет собой олигопептидный фрагмент;

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y = 1;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y больше 1, то по меньшей мере 1 ОР содержит кэпирующую группу; и

причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, и при этом если y больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, где один из фрагментов ОР связан непосредственно, посредством линкера или посредством спейсерной группы с D. Другими словами, множество фрагментов ОР могут быть связаны друг с другом с образованием линейной или разветвленной структуры, которая связана с D посредством одного из фрагментов ОР в указанной линейной или разветвленной структуре. В качестве альтернативы, каждый из множества фрагментов ОР индивидуально связан с D непосредственно, посредством линкера или посредством спейсерной группы. Настоящее изобретение включает промежуточную группировку, где каждый из нескольких фрагментов из множества фрагментов ОР индивидуально связаны с D непосредственное, посредством линкера или посредством спейсерной группы, и где несколько из множества фрагментов ОР сами индивидуально связаны друг с другом, как описано выше, с образованием линейной или разветвленной структурой, в которой один из фрагментов ОР связан непосредственно, посредством линкера или посредством спейсерной группы с D; или предложена их фармацевтически приемлемая соль.

Для ясности, но не в качестве исчерпывающего варианта, если y = 2, в общую структуру включены следующие пролекарства: C-OP-D-OP-C; C-OP-OP-D и C-OP-D-OP. Кэпирующая группа С, таким образом, может присутствовать (посредством непосредственной или опосредованной связи, как описано выше) в одном или более олигопептидных фрагментах ОР в случае пролекарственного соединения/молекулы, содержащих множество олигопептидных фрагментов ОР.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения олигопептидный фрагмент представляет собой пептид, минимальная длина которого составляет 4 последовательных аминокислоты (тетрапептид), а максимальная длина составляет 8 аминокислот (то есть пептид, имеющий длину 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот), и который содержит пролин на карбоксиконце, где указанный пролин связан непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы с лекарственным средством D. Без ограничения, изобретатели предполагают, что данный олигопептидный фрагмент отщепляется/удаляется из лекарственного средства D посредством двустадийного способа, где на первой стадии указанное пролекарство превращают в промежуточное соединение дипептид-лекарственное средство, а на второй стадии превращают указанное промежуточное соединение дипептид-лекарственное средство в свободное лекарство D. В частном варианте реализации настоящего изобретения дипептид, присутствующий в промежуточном соединении дипептид-лекарственное средство, имеет последовательность глицин-пролин (GP), аланин-пролин (AP) или лизин-пролин (KP). Таким образом, задачей настоящего изобретения является обеспечение пролекарств, имеющих вышеуказанную общую формулу, где ОР представляет собой пептид, минимальная длина которого составляет 4 последовательных аминокислоты (тетрапептид), а максимальная длина составляет 8 аминокислот (то есть пептид, имеющий длину 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот), который содержит на карбоксиконце пролин, включая дипептид, выбранный из группы, состоящей из глицина-пролина (GP), аланина-пролина (AP) и лизина-пролина (KP), где пролин указанного пролинсодержащего дипептида связан непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы с лекарственным средством D.

В частности, олигопептидный фрагмент в вышеуказанной структуре представляет собой тетрапептидный фрагмент, имеющий последовательность Ala-Leu-Gly-Pro (3-буквенный код), также обозначенную как ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO:1); или Ala-Leu-Ala-Leu (3-буквенный код), также обозначенную как ALAL (1-буквенный код; SEQ ID NO:2), и/или кэпирующая группа С в вышеуказанной структуре представляет собой фосфоноацетильную группу, и/или лекарственное средство в вышеуказанной структуре представляет собой доксорубин (далее также обозначенную как DOX или Dox). В качестве альтернативы, структура тетрапептида представляет собой ALAP (SEQ ID NO:3), TSAP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10). Соответственно, в одном из вариантов реализации настоящего

го изобретения структура тетрапептида в указанной выше структуре выбрана из группы, состоящей из ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) и KLKP (SEQ ID NO:10). В частности, тетрапептид в указанной выше структуре выбран из ALGP (SEQ ID NO:1) или KLGP (SEQ ID NO:6); в еще более частном варианте тетрапептид в указанной выше структуре представляет собой ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO:1). В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения лекарственное средство (D) в указанной выше структуре представляет собой доксорубицин или его фармацевтически приемлемую соль.

В частности, пролекарство может иметь структуру Соединения I (см. пример 3.1) или может представлять собой его фармацевтически приемлемую соль. Кэпирующая группа фосфоацетил обеспечивает преимущества, заключающиеся в том, что ее наличие позволяет избежать использования неприродных аминокислот на терминальном конце олигопептида. Если лекарственное средство D представляет собой доксорубицин, фосфоацетил в качестве кэпирующей группы С имеет дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении отрицательного заряда, который важен для того, чтобы избежать агрегации олигопептидных производных доксорубицина. В целом, стабильность пролекарства согласно настоящему изобретению может быть определена таким образом, что при инкубировании пролекарства в крови человека в течение более 2 ч должно образовываться менее 10% расщепленных производных.

Вне зависимости от вышеприведенных определений кэпирующей группы С, олигопептидного фрагмента ОР и лекарственного средства, данные определения не ограничивают настоящее изобретение, и другие комбинации также предусмотрены настоящим изобретением. Данные комбинации включают любые ОР и/или D с кэпирующей группой С, представляющей собой фосфоацетильную группу. Другие комбинации включают любую С (любую кэпирующую группу, известную в данной области) и/или любое D с олигопептидным фрагментом ОР, представляющим собой тетрапептидный фрагмент, имеющий последовательность Ala-Leu-Gly-Pro (3-буквенный код) или Ala-Leu-Ala-Leu (3-буквенный код), или ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO:1) или ALAL (1-буквенный код; SEQ ID NO:2). В качестве альтернативы, структура тетрапептида представляет собой ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10). В другом альтернативном варианте структура тетрапептида представляет собой ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10). В частности, тетрапептид в указанной выше структуре выбран из ALGP (SEQ ID NO:1) или KLGP (SEQ ID NO:6); в еще более частном варианте тетрапептид в указанной выше структуре представляет собой ALGP (1-буквенный код; SEQ ID NO: 1).

В зависимости от структуры/химической формулы лекарственного средства, 1 или более олигопептидных фрагментов согласно настоящему изобретению, из которых по меньшей мере один из них кэпирован, могут быть связаны с лекарственным средством. Олигопептидные фрагменты могут сами образовывать линейную или разветвленную структуру, связанную с лекарственным средством или, в качестве альтернативы, каждый из множества олигопептидных фрагментов индивидуально связан с лекарственным средством.

Кэпирующая группа или защитный или кэпирующий фрагмент связаны с олигопептидным фрагментом пролекарства и повышают растворимость и/или стабильность пролекарства (например, в крови животного, млекопитающего, человека или субъекта, которому вводят пролекарство) и/или способствует предотвращению интернализации пролекарства в клетку, такую как клетка-мишень.

Связь между кэпирующей группой и олигопептидом и/или между олигопептидом и терапевтическим агентом или лекарственным средством может быть непосредственной, например, через N-концевую аминогруппу олигопептида, или через C-концевую карбоксильную группу олигопептида, или через боковую цепь одной из аминокислот в олигопептиде.

В качестве альтернативы, указанная связь может быть обосредованной, например, путем введения линкера или спейсерной группы между олигопептидом ОР и лекарственным средством D. В случае цитотоксических соединений, таких как доксорубицин, содержащий свободную аминогруппу (NH_2), линкер между D и ОР сам по себе не требуется, так как ферментативное расщепление амидной связи между D и ОР обеспечивает наличие свободной NH_2 -группы в цитотоксичном лекарственном средстве.

Однако большинство цитотоксических лекарственных средств D против рака не содержит какой-либо свободной NH_2 -группы, и данные лекарственные средства не могут быть самостоятельно связаны с ОР амидной связью. Введение NH_2 -группы в указанные молекулы может уменьшить или подавить их цитотоксическую активность. Для таких лекарственных средств в качестве линкера между лекарственным средством D и олигопептидом ОР может быть использована самоуничтожающаяся (или самоустранивающаяся, самовыводящаяся, самолизирующаяся или самоуходящаяся) спейсерная группа или спейсер. ОР связан с самоуничтожающимся спейсером амидной связью, чувствительной к внеклеточным ферментам, способным активировать пролекарство. После расщепления амидной связи между ОР и спейсером, самоуничтожающийся спейсер самостоятельно отщепляется от лекарственного средства, оставляя его недеприватизированным, то есть оставляя его в его исходной активной форме. Самоуничтожающиеся спейсе-

ры включают парааминобензоилоксикарбонильные фрагменты, которые способны присоединять группы -OH, -COOH, -NH или -SH лекарственного средства с одной стороны к карбоксиконцевой группе пептида с другой стороны. Данный тип линкера представляет собой электронно-каскадный спейсер. Показано, что такая связь поддается расщеплению посредством пептидаз. После расщепления амидной связи ОР-спейсер ароматический амин самоустраняющегося спейсера становится электрондонором, что приводит к вытеснению и высвобождению свободного лекарственного средства и CO₂ (Carl et al. 1981, J Med Chem 24, 479-480; Chakravarty et al. 1983, J Med Chem 26, 638-644; de Groot et al. 1999, J Med Chem 42, 5277-5283, King et al. 2002, J Med Chem 45, 4336-4343). В некоторых патентах и заявках на патенты описаны другие самоуничтожающиеся/самоустраняющиеся спейсеры, такие как гетероциклические спейсеры, высвобождающие лекарственное средство от нацеливающего лиганда, такого как антитело (например, US 6,214,345; US 2003/0130189; US 2003/0096743; US 6,759,509; US 2004/0052793; US 6,218,519; US 6,835,807; US 6,268,488; US 2004/0018194; WO 98/13059; US 2004/0052793; US 6,677,435; US 5,621,002; US 2004/0121940; WO 2004/032828, US 2009/0041791).

Примеры других, необязательно самоустраняемых, линкерных или спейсерных групп включают аминокaproновую кислоту, гидразидную группу, сложноэфирную группу, группу простого эфира и сульфгидрильную группу. Линкер или спейсерная группа, описанные выше, между кэпирующей группой и олигопептидом и/или между олигопептидом и терапевтическим агентом могут быть предпочтительными по таким причинам, как: (I) в качестве разделителя из пространственных соображений, чтобы облегчить ферментативное высвобождение аминокислоты, связанной с терапевтическим агентом, или другие стадии ферментативной активации; (II) чтобы обеспечить надлежащую химию присоединения между различными фрагментами пролекарства (и, таким образом, обеспечить "гибкость" в отношении соединения любого возможного лекарственного средства и/или кэпирующего фрагмента с олигопептидом согласно настоящему изобретению); (III) чтобы улучшить процесс синтеза для получения пролекарственного конъюгата (например, путем предварительной дериватизации терапевтического агента или олигопептида посредством линкерной группы перед конъюгированием для повышения выхода или специфичности); (IV) чтобы улучшить физические свойства пролекарства; или (v) чтобы обеспечить дополнительный механизм внутриклеточного высвобождения лекарственного средства. Независимо от типа связи, непосредственного или опосредованного, связь должна: (1) не нарушать или несущественно нарушать функциональность олигопептидного фрагмента, то есть не должна существенно нарушать ни способность к протеолитическому расщеплению посредством TOP, ни устойчивость к протеолитическому расщеплению посредством CD1 и (2) сохранять стабильность соединения в крови. Определение функциональности кэпированного олигопептидного фрагмента в пролекарстве может быть проведено легко и простым способом, например, как описано в последующем разделе Примеры. Такое тестирование не будет чрезмерно обременительным для специалиста.

Фраза "фармацевтически приемлемая(ые) соль(соли)" при использовании в настоящем документе означает те соли соединений согласно настоящему изобретению, которые являются безопасными и эффективными для предполагаемого медицинского применения и которые обладают необходимой биологической активностью. Фармацевтически приемлемые соли включают соли кислотных или основных групп, присутствующих в соединениях согласно настоящему изобретению. Подходящие соли включают, но не ограничиваются ими, соли алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия, цинка и диэтаноламина. Обзор фармацевтически приемлемых солей см., например, в источниках Berge et al. 1977 (J. Pharm. Sci. 66, 1-19) или Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (P. H. Stahl, C.G. Wermuth (Eds.), August 2002), включенных в настоящее описание посредством ссылки.

Лекарственное средство или терапевтический агент, конъюгированные с олигопептидом согласно настоящему изобретению могут быть подходящими для применения для лечения рака (например, путем проявления цитотоксической или антиангиогенной активности), воспалительного заболевания или некоторых других медицинских состояний. Лекарственное средство или терапевтический агент, конъюгированные с олигопептидом согласно настоящему изобретению, могут представлять собой любое лекарственное средство или терапевтический агент, способные проникать в клетку-мишень. Таким образом, терапевтический агент может быть выбран из числа классов соединений, включающих, антибиотики, алкилирующие агенты, антипролиферативные агенты, тубулинсвязывающие агенты, алкалоиды барвинка, эндиины, подофиллотоксины или производные подофиллотоксинов, лекарственные средства семейства птеридина, таксаны, антрациклины, доластатины, ингибиторы топоизомеразы, химиотерапевтические агенты с координационными комплексами с платиной и майтансиноиды. В более частном варианте указанное лекарственное средство или терапевтический агент может представлять собой одно из следующих соединений, или его производное, или аналог: доксорубин, даунорубин, амрубин, винбластин, винкристин, калихеамицин, этопозид, этопозид фосфат, CC-1065, дуокармицин, KW 20 2189, метотрексат, метоптерин, аминоптерин, дихлорметотрексат, доцетаксел, паклитаксел, эпитиолон, комбретагестин, комбретагестин A4 фосфат, доластин 10, доластин 11, доластин 15, топотекан, камптотецин, митомидин C, порфирамицин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, флударабин, тамоксифен, цитозинарабинозид, аденозин-арабинозид, колхицин, галихондрин B, цисплатин, карбоплатин, митомидин C, блеомицин, мелфалан, хлорохин, циклоспорин A и майтансин. Под производным подразумевают соединение, кото-

рое образуется в результате реакции целевого соединения с другим химическим фрагментом (отличным от олигопептидного фрагмента, связанного непосредственно или опосредованно с соединением) и которое включает в себя фармацевтически приемлемую соль, кислоту, основание или сложный эфир указанного соединения. Другие терапевтические агенты или лекарственные средства включают в себя: виндизин, винорелбин, 10-деацетилтаксол, 7-эпитаксол, баккатин III, 7-силозилтаксол, изотаксел, ифосфамид, хлораминофен, прокарбазин, хлорамбуцил, тиофосфорамид, бусульфан, дакарбазин (DTIC), гелданамицин, нитрозомочевины, эстрамустин, BCNU, CCNU, фотемустин, стрептонигрин, оксалиплатин, метотрексат, аминоптерин, ралтитрексед, гемцитабин, кладрибин, клофарабин, пентостатин, гидроксимочевины, иринотекан, топотекан, 9-диметиламинометилгидроксикампитотетина гидрохлорид, тенипозид, амсакрин, митоксантрон; L-канаванин, ТНР-адриамицин, идарубицин, рубидазон, пирарубицин, зорубицин, акларубицин, эпиадриамицин (4'-эпи-адриамицин или эпирубицин), митоксантрон, блеомицины, актиномицины, в том числе актиномицин D, стрептозотозин, калихеамицин; L-аспарагиназу; гормоны; чистые ингибиторы ароматазы; андрогены, ингибиторы протеасом; ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI); эпотилоны; дискодермолит; фостриецин; ингибиторы тирозинкиназ, такие как STI 571 (иматиниба мезилат); ингибиторы рецепторов тирозинкиназ, такие как эрлотиниб, сорафениб, вандетаниб, канертиниб, PKI 166, gefитиниб, сунитиниб, лапатиниб, EKB-569; ингибиторы Bcr-Abl-киназы, такие как дазатиниб, нилотиниб, иматиниб; ингибиторы киназы Aurora, такие как VX-680, CYC116, PHA-739358, SU-6668, JNJ-7706621, MLN8054, AZD-1152, PHA-680632; ингибиторы CDK, такие как флавопиродол, селициклиб, E7070, BMS-387032; ингибиторы MEK, такие как PD184352, U-0126; ингибиторы mTOR, такие как CCI-779 или AP23573; ингибиторы кинезина - белка веретена, такие как испинесиб или MK-0731; ингибиторы RAF/MEK, такие как сорафениб, CHIR-265, PLX-4032, CI-1040, PD0325901 или ARRY-142886; бриостатин; L-779450; LY333531; эндостатины; HSP 90-связующий агент гелданамицин, макроциклические полиэферы, такие как галихондрин В, эрибулин. Для ряда соединений, включенных в вышеприведенный список, более подробное экспериментальное руководство приведено в данном описании в примере 16. К лекарственным средствам, отличным от доксорубина, охваченным настоящим изобретением, настоящим изобретением охвачен амрубицин, который является аналогом антрациклина со свободной NH₂-группой (Hanada et al. 1998, Jpn J Cancer Res 89, 1229-1238), который может быть связан с кэпированным олигопептидом, таким как PhAc-ALGP, тем же способом, который используется для доксорубина. Добавление (а) полиэтиленгликолевой(ых) группы (групп) к аминогруппе олигопептидного фрагмента может быть произведено для того, чтобы увеличить период полужизни пролекарства в соответствии с изобретением в кровотоке после введения млекопитающему. Добавление (а) полиэтиленгликолевой(ых) группы (групп) также может играть роль блокирующего агента.

Пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению может дополнительно присутствовать в композиции, содержащей, кроме пролекарства или его соли любого из подходящего растворителя (способного сольбуилизовать пролекарство до желаемой степени), разбавитель (способный разбавлять концентрированное пролекарство до желаемой степени) или носитель (любое соединение, способное поглощать, прикреплять или инкорпорировать пролекарство и затем высвобождать в любом количестве пролекарство во внеклеточный компартмент тела субъекта). Указанная композиция может в качестве альтернативы содержать множество (то есть более 1) пролекарств или его солей или любую их комбинацию (например, пролекарство 1 + его соль, пролекарство 1 + пролекарство 2, пролекарство 1 + его соль + пролекарство 2 и т. д.). В частности, указанный растворитель, разбавители или носитель являются фармацевтически приемлемыми, то есть приемлемыми для введения субъекту, подлежащего лечению композицией согласно настоящему изобретению. В помощь для разработки фармацевтически приемлемой композиции, может быть, например Фармакопоя. Композиция может быть приготовлена таким образом, что она подходит для любого пути введения, включая внутривенное, внутриспинное, энтеральное и парентеральное введение. Схема, по которой вводят пролекарство, может отличаться, например, в зависимости от наличия или отсутствия кэпирующей группы, в зависимости от состава, в зависимости от общего физического состояния субъекта, подлежащего лечению, и, например, в зависимости от решения лечащего врача.

Пролекарство, или его соль согласно настоящему изобретению, или содержащая их композиция, особенно подходит для лечения заболевания, которое поддается лечению высвобождаемым лекарственным средством. Особый интерес представляет собой рак или опухоли, такие как солидные опухоли. "Рак" включает, например, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак легких, такой как мелкоклеточный рак, немелкоклеточный рак, рак бронхов, рак предстательной железы, рак яичников, рак головного мозга и рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак желудка, рака мочевого пузыря, неходжкинскую лимфому, меланомы, лейкозы, нейробластомы и глиобластомы. Субъект, подлежащий лечению посредством пролекарства согласно настоящему изобретению, может представлять собой любое млекопитающее, нуждающееся в таком лечении, в частности это может человек. Лечение может привести к регрессии заболевания (например, с точки зрения уменьшения объема опухоли или опухолевой массы и метастазов), снижению прогрессирования заболевания по сравнению с ожидаемым прогрессированием заболевания или к стабилизации заболевания, то есть ни регрессии, ни прогрессирования заболевания. Всё это благоприятные результаты лечения. В частности, эффективные ко-

личества указанного пролекарства или его соли, или указанной композиции, не вызывают сильную лейкопению или токсичность для сердца/кардиотоксичность. Возможное определение тяжелой человеческой лейкопении представляет собой определенная по критериям ВОЗ лейкопения класса 3 (1000-1900 лейкоцитов/мл) или класса 4 (менее 1000 лейкоцитов/мл).

Также предусмотрено включение противоракового пролекарства (или его соли) согласно настоящему изобретению в комбинированной терапии. Это может быть лечение с комбинацией способов химиотерапии, то есть применение противоракового пролекарства (или его соли) с другими видами лечения против рака, такими как лучевая терапия (либо посредством прямого облучения, либо посредством введения меченого изотопом антитела или фрагмента антитела) или хирургии. Это также может быть в комбинированной химиотерапии, то есть лечении пациента множеством различных лекарственных средств, где указанные лекарственные средства предпочтительно различаются по механизму их действия и их побочным эффектам. Обычно в такой комбинированной химиотерапии лекарственные средства вводят одновременно. Преимуществом комбинированной химиотерапии является минимизация возможности развития устойчивости к какому-либо одному агенту. Еще одно преимущество может состоять в том, что каждое из отдельных лекарственных средств может быть применено в более низкой дозе с обеспечением тем самым снижения общей токсичности.

Пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению, или композиция, содержащая такое пролекарство или соль, таким образом, могут быть применены для лечения заболевания (например, рака), в виде монотерапии или в составе лечения комбинацией химиотерапевтических агентов или лечения к комбинацией способов химиотерапии. В более общем варианте по отношению к комбинированной химиотерапии, пролекарство против рака (или его соль) согласно настоящему изобретению может быть объединено с одним или более алкилирующим(и) противоопухолевым(и) агентом(ами), и/или одним или более антиметаболитом(ами), и/или один или более агентом(ами) против микротрубочек, и/или одним или более ингибитором(ами) топоизомеразы, и/или одним или более цитотоксическим(и) антибиотиком(ами), и/или одним или более биологического(их) агента(ов) против рака (например, антителами), где один или более из них, когда это применимо, также может представлять собой пролекарство(а) (или ее соль) согласно настоящему изобретению.

Лекарственное средство доксорубин (также известно под торговыми названиями Адриамицин или Рубекс) обычно используется для лечения нескольких типов рака, таких как некоторые лейкозы и лимфома Ходжкина, а также рак мочевого пузыря, молочной железы, желудка, легких, яичников, щитовидной железы, саркомы мягких тканей, множественной миеломы и других. Доксорубин также применяют в различных видах комбинированной терапии. Доксорубинсодержащие виды терапии включают АС или СА (Адриамицин, циклофосфамид), ТАС (Таксотер, АС), АВВД (Адриамицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин), ВЕАСОРР (блеомицин, этопозид, Адриамицин (доксорубин), циклофосфамид, Онковин (винкристин), прокарбазин, преднизон), СНОР (циклофосфамид, Адриамицин, винкристин, преднизолон), FАС или САF (5-фторурацил, Адриамицин, циклофосфамид), MVAC (метотрексат, винкристин, адриамицин, цисплатин), САV (циклофосфамид, доксорубин, винкристин) и CAVE (CAV, этопозид), CVAD (циклофосфамид, винкристин, адриамицин, дексаметазон), DT-PACE (дексаметазон, талидомид, цисплатин или платинол, адриамицин, циклофосфамид, этопозид), m-BACOD (метотрексат, блеомицин, адриамицин, циклофосфамид, винкристин, дексаметазон), MACOP-B (метотрексат, лейковорин, адриамицин, циклофосфамид, винкристин, преднизон, блеомицин), Pro-MACE-MOPR (метотрексат, адриамицин, циклофосфамид, этопозид, мехлорэтамин, винкристин, прокарбазин, преднизон), Pro-MACE-СytaBOM (преднизон, доксорубин, циклофосфамид, этопозид, цитарабин, блеомицин, винкристин, метотрексат, лейковорин), Станфорд V (Stanford V) (доксорубин, мехлорэтамин, блеомицин, винбластин, винкристин, этопозид, преднизолон), DD-4A (винкристин, актиномицин, доксорубин), VAD (винкристин, доксорубин, дексаметазон), Режим I (Regimen I) (винкристин, доксорубин, этопозид, циклофосфамид) и VAPES-B (винкристин, доксорубин, преднизон, этопозид, циклофосфамид, блеомицин). Кроме доксорубинсодержащих комбинированных видов химиотерапии существует множество других комбинированных видов химиотерапии, таких как ВЕР (блеомицин, этопозид, платиносодержащий агент (цисплатин (Платинол))), CAPOX или XELOX (капецитабин, оксалиплатин), CBV (циклофосфамид, кармустин, этопозид), FOLFIRI (фторурацил, лейковорин, иринотекан), FOLFIRINOX (фторурацил, лейковорин, иринотекан, оксалиплатин), FOLFOX (фторурацил, лейковорин, оксалиплатин), ЕС (эпирубин, циклофосфамид), ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид (VP-16)) и IFL (иринотекан, лейковорин, фторурацил). Комбинация доксорубина с сиролимусом (рапамицином) была раскрыта Верделом и др. (Wendel et al), 2004 (Nature 428, 332-337), для лечения Akt-положительных лимфом у мышей. В любом из этих видов комбинированной терапии любое из лекарственных средств может быть замещено пролекарством (или его солью) согласно настоящему изобретению.

Также дополнительно можно предусмотреть виды комбинированной терапии, включающие пролекарство против рака (или его соль) согласно настоящему изобретению (либо отдельно, либо как часть лечения комбинацией химиотерапевтических агентов или как часть лечения с комбинацией способов терапии) и соединения, отличные от цитостатиков. Такие другие соединения включают любое соединение, одобренное для лечения рака или разрабатываемое для лечения рака. В частности, такие другие со-

единения включают моноклональные антитела, такие как алемтузумаб (хронический лимфоцитарный лейкоз), бевацизумаб (колоректальный рак), цетуксимаб (колоректальный рак, рак головы и шеи), деносумаб (метастазы солидных опухолей в костях), гемтузумаб (острый миелобластный лейкоз), ипилимумаб (меланома), офатумумаб (хронический лимфоцитарный лейкоз), панитумумаб (колоректальный рак), ритуксимаб (неходжкинская лимфома), тозитумумаб (неходжкинская лимфома) и трастузумаб (рак молочной железы). Другие антитела включают, например, абаговомаб (рак яичников), адекватумумаб (рак простаты и рак молочной железы), афутузумаб (лимфома), аматуксимаб, аполизумаб (гематологический рак), блинатумумаб, циксутумумаб (солидные опухоли), дацетузумаб (гематологический рак), элотузумаб (множественная миелома), фарлетузумаб (рак яичников), интетумумаб (солидные опухоли), Матузумаб (колоректальный рак, рак легких и рак желудка), онартузумаб, парсатузумаб, притумумаб (рак головного мозга), тремелимумаб, ублитуксимаб, велтузумаб (неходжкинская лимфома), вотумумаб (колоректальные опухоли), затуксимаб и антитела против плацентарного фактора роста, такие как описано в WO 2006/099698. Примеры таких видов комбинированной терапии включают, например, CNOP-R (CNOP (см. выше)+ ритуксимаб), ICE-R (ICE (см. выше) + ритуксимаб), R-FCM (ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид, митоксантрон) и TCH (Паклитаксел (Таксол), карбоплатин, трастузумаб).

Примеры алкилирующих противоопухолевых агентов включают азотсодержащие мустанды (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, ифосфамид и бусульфид), нитрозомочевины (например N-нитрозо-N-метилмочевина (MNU), кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (MeCCNU), фотемустин и стрептозотоцин), тетразины (например, дакарбазин, митозоломид и темозоломид), азиридины (например тиотепа, митомицин и диазиковон (AZQ)), цисплатины и производные (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин) и неклассические алкилирующие агенты (например, прокарбазин и гексаметилмеламин).

Подтипы антиметаболитов включают антифолаты (например, метотрексат и пеметрексед), фторпиримидины (например, фторурацил, капецитабин и тегафур/урацил), аналоги дезоксинуклеозидов (например, цитарабин, гемцитабин, децитабин, Видаза, флударабин, неларабин, кладрибин, клофарабин и пентостатин) и тиопурины (например, тиогуанин и меркаптопурин).

Агенты против микротрубочек включают подтипы алкалоидов барвинка (например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин и винфлунин) и подтипы таксана (например, паклитаксел и доцетаксел). Другие агенты против микротрубочек включают подофиллотоксин.

Ингибиторы топоизомеразы включают ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан, топо-текан и камптотецин) и ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, доксорубин, митоксантрон, тенипозид, новобиоцин, мербарон и акларубин).

Цитотоксические антибиотики включают антрациклины (доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин, пирарубин, акларубин и митоксантрон) и другие лекарственные средства, включая актиномицин, блеомицин, пликамицин и митомицин.

Любое пролекарство против рака (или его соль) согласно настоящему изобретению может (либо отдельно, либо уже как часть лечения комбинацией химиотерапевтических агентов или как часть лечения с комбинацией способов терапии) быть дополнительно включено в терапию ферментативным пролекарством, нацеленным на антитело (ADEPT, англ.: antibody directed enzyme prodrug therapy), которая включает применение ассоциированных с раком моноклональных антител, которые связаны с ферментом, активирующим лекарственное средство. Последующее системное введение нетоксичного агента приводит к превращению его в токсичное лекарственное средство и в результате к цитотоксическому эффекту, который может быть направлен на злокачественные клетки (Bagshawe et al. (1995) Tumor Targeting 1, 17-29.)

Кроме того, любое пролекарство против рака (или его соль) согласно настоящему изобретению может (либо отдельно, либо уже как часть лечения комбинацией химиотерапевтических агентов или как часть лечения с комбинацией способов терапии) быть комбинировано с одним или более агентом(ами), способным(и) обращать устойчивость (мульти)лекарственного средства ((M)DR "обратителем(ями)" или (M)DR обращающим(и) агентом(ами)), которая может возникнуть во время химиотерапии. Такие агенты включают, например, лоперамид (Zhou et al. 2011, Cancer Invest 30, 119-125). Другая такая комбинация включает помещение пролекарства в наночастицы, такие как наночастицы оксида железа (Kievit et al. 2011, J Control Release 152, 76-83) или липосомы. Примеры лекарственных средств, помещенных в липосомы, включают доксорубин (липосомы с доксорубин HCl, также известные под торговыми наименованиями Доксил (Doxil), Каеликс (Caelyx) или Миоцет (Myocet)), даунорубин (известный под торговым наименованием ДауноКом (DaunoXome)) и паклитаксел (Garcion et al. 2006, Mol Cancer Ther 5, 1710-1722).

Пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению, или композиция, содержащая такое пролекарство или соль, таким образом, могут быть применены для лечения заболевания (например, рака), в виде монотерапии или как часть лечения с применением комбинации химиотерапевтических агентов или лечения с комбинацией способов химиотерапии. Любое из таких видов лечения может дополнительно быть комбинировано с лечением, включающим агент, обращающий устойчивость к лекарственным средствам.

Настоящее изобретение также относится к способам получения пролекарств согласно настоящему

изобретению, где указанные способы включают стадии:

- (i) получения лекарственного средства;
- (ii) связывания лекарственного средства с фосфоноацетил-эпированным олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; или, в качестве альтернативы,
- (ii') связывания лекарственного средства с олигопептидным фрагментом с последующим связыванием фосфоноацетильной эпирующей группы с олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; и
- (iii) очистки пролекарства, полученного на стадии (ii) или (ii').

Как описано выше, указанное связывание олигопептидного фрагмента с лекарственным средством и/или эпирующей группой может быть непосредственным или опосредованным, осуществляемым посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающийся или самоустраняющийся спейсер. Стратегия очистки пролекарства, очевидно, будет зависеть от природы лекарственного средства и/или эпирующей группы. Специалист сможет разработать подходящую стратегию очистки для любого возможного пролекарства согласно настоящему изобретению, выбирая из множества доступных способов очистки.

Не ограничиваясь какой-либо теорией или объяснением, картина, вырисовывающаяся исходя из примеров, описанных в настоящем документе, такова, что для конкретного пролекарства согласно настоящему изобретению, содержащего пептид ALGP (SEQ ID NO:1) в качестве ОР-фрагмента и доксорубицин в качестве лекарственного средства D, активацию пролекарства осуществляют в несколько стадий. Поскольку такое пролекарство стабильно в крови и плазме, при инкубировании в присутствии опухолевых клеток LS-174T оно превращается в смесь доксорубина (Dox), GP-Dox и LGP-Dox. Последний процесс может быть на первой стадии имитирован *in vitro* посредством протеаз, таких как CD10 (с получением LGP-Dox, который может быть превращен в GP-Dox посредством обычных лейцинаминопептидаз) и TOP (с получением GP-Dox). Первая фаза активации ALGP-доксорубина управляется посредством предпочтительной активности CD10 и TOP вблизи опухолей по сравнению с их меньшим избытком в непатологических внеклеточных компартментах и тканях. Вторая стадия, превращение GP-Dox в Dox, может управляться дипептидилпролилпептидазами. Два представителя этого класса представляют интерес в области лечения рака: DPIV, также известная как CD26, и FAP, или белок активации фибробластов. Известно, что все эти протеазы ассоциированы с опухолевыми клетками или опухолевыми стромальными клетками, как описано далее. Такая многостадийная активация пролекарства согласно настоящему изобретению увеличивает специфичности и уменьшает нежелательные побочные эффекты (такие как лейкопения и токсичность для сердца) по сравнению с действием аналогичных пролекарств, активируемых в одну стадию. Примером последних является сукцинил- β -ALAL-доксорубин, который легко превращается посредством, например, CD10, в L-Dox, который может входить в клетку самостоятельно (Pan et al. 2003, Cancer Res 63, 5526-5531). Подход с множеством стадий активации позволил получить пролекарство PhAc-ALGP-доксорубин, которое примерно от 20 до 40 раз менее токсично, чем доксорубин в зависимости от способа (в.в. или в.б.) введения и от 6 до 14 раз менее токсично, чем сукцинил- β -ALAL-доксорубин. PhAc-ALGP-доксорубин лишен хронической кумулятивной кардиотоксичности и не вызывает лейкопению и лимфопению.

Он более активен, чем доксорубин, в отношении ксенотрансплантатов опухолей человека (включая саркому) в отношении ортопической карциномы толстой кишки. Пролекарства согласно настоящему изобретению, таким образом, дополнительно характеризуются тем, что они подлежат активации, *in vitro* или *in vivo*, по меньшей мере в две стадии, то есть в процессе, включающем по меньшей мере два существенных протеолитических расщепления посредством по меньшей мере двух различных протеаз. "Существенное протеолитическое расщепление" в настоящем документе означает расщепление, которое ассоциировано с опухолью или опухолеассоциированными клетками, такими как ее строма, то есть специфично возникающее в непосредственной близости к опухолевым или опухолеассоциированным клеткам. Эндопептидазы CD10 и TOP CD10 представляет собой нейтральную эндопептидазу/цинк-зависимую поверхностную металлопептидазу, которая расщепляет небольшие пептиды с аминоконца гидрофобных аминокислот. Кроме присутствия в нормальных клетках, таких как В-клетки и клетки эпителия легкого, толстой кишки и почки, она присутствует во многих типах опухолей (Ravel et al. 2008, Clin Cancer Res 14, 1258-1265), таких как рак поджелудочной железы (Notohara et al. 2000, Am J Surg Pathol 24, 1361-1371), гепатоцеллюлярная карцинома (Karabork et al. 2010, Pathol Res Pract 206, 572-577), меланома (Velazquez et al. 2007, J Transl Med 5, 2), рак предстательной железы (Song et al. 2004, Prostate 58, 394-405), мелкоклеточные карциномы легких (Shipp et al. 1991, Proc Natl Acad Sci USA 88, 10662-10666), карцинома почки, саркома эндометрия и рабдомиосаркома (Chu et al. 2000, Am J Clin Pathol 113, 374-382). CD10 экспрессируется приблизительно в половине сарком мягких тканей (гистиоцитомах, фибросаркомах, рабдомиосаркомах, лейомиосаркомах, липосаркомах, злокачественных опухолях оболочек периферических нервов; Deniz et al. 2012, Pathol Res Pract 208, 281-285). Что даже более интересно и похоже на стромальное распределение FAP, CD10 обнаружена в стромальных клетках колоректальных карцином (Hirano et al. 2012, Pathol Int 62,600-611), рака молочной железы (Desmedt et al. 2012, Clin Cancer Res 18,

1004-1014; Marketsov et al. 20, 84-89), эндокринных опухолей поджелудочной железы (Deschamps et al. 2006, Hum Path 37, 802-808), карциномы желудка (Huang et al. 2005, Jpn J Clin Oncol 35, 245-250) и базальноклеточной карциномы (Yada et al. 2004, Am J Dermatopathol 26, 463-473).

ТОР (тимет-олигопептидаза) представляет собой тимолазисимую основную цитоплазматическую металлоэндопротеазу, распространенную во многих типах тканей и клеток. Она может достигать местоположения за пределами клетки, как благодаря секреции данного растворимого фермента, так и путем присоединения к плазматической мембране. Он распространена во многих типах тканей и клеток. ТОР участвует в нейроэндокринной сигнализации и во внеклеточном метаболизме нейропептидов (Corie et al. 2002, Endocrine Rev 23, 647-664). Она участвует в метаболизме протеасом (Saric et al. 2004, J Biol Chem 45, 46723-46732). ТОР участвует в обработке нейропептидов в простате и при раке предстательной железы (Swanson et al. 2004, Protein Pept Lett 5, 471-478) и обнаружена в средах, кондиционируемых опухолевыми клетками. Она также может высвобождаться из поврежденных или некротизированных клеток. Ее активность уменьшается в средах к кислородом и увеличивается в бескислородных средах, которые очень часто характерны для солидных опухолей. ТОР экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток и играет роль в метаболизме вазоактивных пептидов (Norman et al. 2003, Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, H1978-1984; Shivakumar et al. 2005, Cell Biochem Funct 23, 195-204). Тор обнаруживается посредством иммунного окрашивания в 113 из 147 саркомах молочной железы как в опухолевых, так и в стромальных клетках. Она экспрессирована как в карциноме, так и в стромальных клетках в 88 биопсиях из 98 (Ravel et al. 2008, Clin Cancer Res 14, 1258-1265). ТОР отвечает за внеклеточную активацию сукцинил-β-ALAL-доксорубина и PhAc-ALGP-доксорубина (Dubois et al. 2006, Eur J Cancer 17, 3049-3056). Дипептидилпролилпептидазы DPIV (CD26) и FAP DPIV представляет собой дипептидилпролилпептидазу, обладающую широким спектром активности, и охватывает большое число физиологических субстратов. Она экспрессируется в эпителиальных клетках большого числа органов. Она экспрессируется в тимусе, селезенке и лимфатических узлах, а также в лимфоцитах. DPIV связывается с коллагеном и фибронектином в экспериментальных условиях (Loster et al. 1995, Biochem Biophys Res Commun 217, 341). Она повышающее регулируется в опухолевых Т-клеточных злокачественных новообразованиях (Dang et al. 2002, Histol Histopathol 17, 1213-1226) и в различных аденокарциномах, таких как гепатоцеллюлярная карцинома (Stecca et al. 1997, J Hepatol 27, 997-945), карцинома щитовидной железы (Tanaka et al. 1995, Int J Cancer 64, 326-331), в менингиомах (Yu et al. 2010, FEBS Journal 277, 1126-1144; Stremenoova et al. 2010, Int J Oncology 36, 351-358), в аденокарциномах пищевода (Goscinski et al. 2008, AP-MIS 116, 823-831), в аденокарциномах легких (Asada et al. 1993, Histopathology 23, 265-270) и в опухолях костей и мягких тканей (Dohi et al. 2009, Histopathology 4, 432-440). DPIV экспрессируется в раковых стволовых клетках колоректального рака человека и мезомелиомах человека (Pang et al. 2010, Cell Stem Cell 6, 603-615; Yamazaki et al. 2012, Biochem Biophys Res Commun 419, 529-536).

FAP представляет собой дипептидилэкзопептидазу с очень узкой специфичностью, ограниченной дипептидами глицин-пролин, аланин-пролин и лизин-пролин и также коллагеназой типа I. Тем не менее, она может функционировать как эндопептидаза (Siew lai et al. 2007, Bioconj Chem 18, 1245-1250). FAP отсутствует в нормальных тканях взрослых, таких как эпителиальные, мезенхимальные; нервных и лимфоидных клетках, таких как лимфоциты. Она отсутствует в незлокачественных опухолях. Что более важно, она повышающее регулируется не в самих опухолевых клетках, а в реактивных фибробластных, стромальных и ангиогенных клетках, присутствующих в эпителиальных опухолях или опухолях типа саркомы за исключением саркомы Юинга (Yu et al. 2010, FEBS Journal 277, 1126-1144; Brennen et al. 2012, Mol Cancer Ther 11, 257-269). Она играет важную роль в раке толстой кишки (Leonard et al. 2007, Clin Cancer Res 13, 1736-1741), меланоме (Fazakas et al. 2011, PLoS one 6, e20758; Artym et al. 2002, Carcinogenesis 23, 1593-1601), раке поджелудочной железы (Hyung-Ok et al. 2011, BMC Cancer 11, 245; Min et al. 2012, World J Gastroenterol 28, 840-846), раке желудочно-кишечного тракта (Zhi et al. 2010, J Exp Clin Cancer Res 29, 66; Mori et al. 2004, Oncology 67, 411-419), немелкоклеточном раке легкого (Bremnes et al. 2011, J Thorac Oncol 1, 209-217), глиоме (Menlein 2011, Biol Chem 392, 199-207), видах рака кожи (Huber et al. 2006, J Cut Pathol 2, 145-155), карциноме шейки матки (Jin et al. 2003, Anticancer Res 4, 195-0198), карциноме щитовидной железы (Nocolini et al. 2011, Biochem Pharmacol 7, 778-780), карциноме прямой кишки (Saaigusa et al. 2011, Int J Oncol 3, 655-663), карциноме пищевода (Goscinski et al. 2008, Ultrastruct Pathol 3, 89-96), в раке молочной железы (Huang et al. 2011, Clin Exp Metastasis 6, 567-579), и в опухолях кости и мягких тканей (Dohi et al. 2009, Histopathology 4, 432-440). Реактивные стромальные клетки опухолевых клеток важны для роста опухолевых клеток, а также для обеспечения их инвазивных и ангиогенных способностей (Santos et al. 2009, J Clin Invest 119, 3613-3625; Cheng et al. 2002, Cancer Res 62, 4767-4772; Huang et al. 2004, Cancer Res 64, 2712-2716).

На основании представленных примеров (см., например, пример 16), может быть предусмотрено несколько способов скрининга пролекарств-кандидатов согласно настоящему изобретению. Такие способы включают способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих следующую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу;

ОР представляет собой пептид, минимальная длина которого составляет 4 последовательных ами-

нокислоты (тетрапептид), а максимальная длина составляет 8 аминокислот (то есть пептид, имеющий длину 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот), который содержит на карбоксиконце пролин, включая дипептид, выбранный из группы, состоящей из глицина-пролина (GP), аланина-пролина (AP), и лизина-пролина (KP);

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y больше 1, то по меньшей мере 1 OP содержит эпирующую группу; и

причем связь между C и OP и связь между OP и D являются непосредственной или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающаяся или самоустраняющаяся спейсерная группа, и при этом если y больше 1, множество фрагментов OP индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; и где указанный способ скрининга включает стадии: (i) получения лекарственного средства D;

(ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с дипептидом GP, AP или KP с получением GP-D, AP-D или KP-D в качестве промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство;

(iii) приведения каждого из лекарственного средства D и указанного промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D независимо в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками;

(iv) определения цитотоксичности лекарственного средства D и промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D;

(v) идентификации по данным (iv) промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D с цитотоксической активностью, сопоставимой с цитотоксической активностью лекарственного средства D; и

(vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, соответствующего промежуточному пролекарству дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D, идентифицированному на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В вышеуказанном способе термин "соответствующего" следует понимать таким образом, что выбранное пролекарство-кандидат $[C_x-OP]_y-D$ содержит то же лекарственное средство D, которое присутствует в промежуточном пролекарстве дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D, которое, как установлено, имеет цитотоксическую активность, сопоставимую с цитотоксической активностью лекарственного средства D. Необязательно, лекарственное средство D соединено с олигопептидным фрагментом OP таким же образом, как оно соединено с дипептидом GP, AP или KP в промежуточном пролекарстве дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D. Другими словами, положительный результат стадии (v) по идентификации промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D является показательным или позволяет предсказать положительный результат в отношении пролекарства-кандидата $[C_x-OP]_y-D$, где OP представляет собой пептид, минимальная длина которого составляет 4 последовательных аминокислоты (тетрапептид), а максимальная длина составляет 8 аминокислот (то есть пептид, имеющий длину 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот), и который содержит на карбоксиконце пролин, включая дипептид, выбранный из группы, состоящей из глицина-пролина (GP), аланина-пролина (AP) и лизина-пролина (KP). Такая экстраполяция является оправданной ввиду большого количества результатов, описанных в настоящем документе, полученных для доксорубина в качестве пролекарства D. Если промежуточное пролекарство дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D имеет цитотоксическую активность, сопоставимую с цитотоксической активностью лекарственного средства D, это является хорошим признаком успешной активации такого пролекарства с получением свободного лекарственного средства D культивируемыми клетками. Культивируемые клетки, используемые при данном типе скрининга, могут представлять собой, например, культивируемую линию опухолевых клеток.

В частном варианте реализации настоящего изобретения пептид OP в вышеуказанной общей структуре представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10). Таким образом, в указанном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих общую структуру:



где C представляет собой эпирующую группу;

OP представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10); в частности, OP представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO:1); D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y больше 1, то по меньшей

шей мере 1 ОР содержит кэпирующую группу; и

причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающаяся или самоустраняющаяся спейсерная группа, и при этом если у больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; и где указанный способ скрининга включает стадии:

- (i) получения лекарственного средства D;
- (ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с дипептидом GP, AP или KP с получением GP-D, AP-D или KP-D в качестве промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство;
- (iii) приведения каждого из лекарственного средства D и указанного промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D независимо в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками;
- (iv) определения цитотоксичности лекарственного средства D и промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D;
- (v) идентификации по данным (iv) промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D с цитотоксической активностью, сопоставимой с цитотоксической активностью лекарственного средства D; и
- (vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, соответствующего промежуточному пролекарству дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D, идентифицированному на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В качестве альтернативы, указанные способы представляют собой способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих общую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO: 10); в частности, ОР представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO: 1); D представляет собой лекарственное средство;

х представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если у = 1;

у представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если у больше 1, то по меньшей мере 1 ОР содержит кэпирующую группу; и

причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающийся или самоустраняющийся спейсер, и при этом если у больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; где указанный способ включает стадии:

- (i) получения лекарственного средства D;
- (ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с $[C_x-OP]_y$ с получением пролекарства $[C_x-OP]_y-D$; (iii) приведения каждого из лекарственного средства D и пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ независимо в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками;
- (iv) определения цитотоксичности лекарственного средства D и пролекарства $[C_x-OP]_y-D$; (v) идентификации по данным (iv) пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ с цитотоксической активностью, сопоставимой с цитотоксической активностью лекарственного средства D; и
- (vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, идентифицированного на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В вышеуказанных способах скрининга термин "сопоставимая цитотоксическая активность" следует понимать таким образом, что пролекарство после контакта с культивируемыми *in vitro* клетками (такими как культивируемые опухолевые клетки), проявляет по меньшей мере 50% или по меньшей мере от 50 до 99% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%) цитотоксической активности, проявляемой свободным лекарственным средством, приведенным в контакт с теми же культивируемыми *in vitro* клетками в тех же условиях.

Согласно другой альтернативе указанные способы представляют собой способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих общую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO: 10); в частности, ОР представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO: 1);

D представляет собой лекарственное средство;
 x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;
 y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y больше 1, то по меньшей мере 1 OP содержит копирующую группу; и
 причем связь между C и OP и связь между OP и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающийся или самоустраняющийся спейсер, и при этом если y больше 1, множество фрагментов OP индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; где указанный способ включает стадии: (i) получения лекарственного средства D;
 (ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с $[C_x-OP]_y$ с получением пролекарства $[C_x-OP]_y-D$;
 (iii) приведения пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками в течение 5 ч при 37°C;
 (iv) определения конверсии пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ в свободное лекарственное средство D;
 (v) идентификации по данным (iv) пролекарства $[C_x-OP]_y-D$, которое по меньшей мере на 50% превратилось в D; и
 (vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, идентифицированного на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.
 Согласно другой альтернативе указанные способы представляют собой способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих общую структуру:



где C представляет собой копирующую группу;
 OP представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO: 10); в частности, OP представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO: 1);

D представляет собой лекарственное средство;
 x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;
 y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y больше 1, то по меньшей мере 1 OP содержит копирующую группу; и
 причем связь между C и OP и связь между OP и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающийся или самоустраняющийся спейсер, и при этом если y больше 1, множество фрагментов OP индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; где указанный способ включает стадии:
 (i) получения лекарственного средства D;
 (ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с дипептидом GP, AP или KP с получением промежуточного пролекарства GP-D, AP-D или KP-D дипептид-лекарственное средство;
 (iii) приведение указанного промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D в течение 3 ч при 37°C в контакт с выделенными пептидазами FAP и/или DPiV;
 (iv) определение степени превращения промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D в свободное лекарственное средство D;
 (v) идентификации по данным (iv) промежуточного пролекарства дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D, которое по меньшей мере на 50% превратилось в D; и
 (vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, соответствующего промежуточному пролекарству дипептид-лекарственное средство GP-D, AP-D или KP-D, идентифицированному на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В вышеуказанном способе термин "соответствующего" следует понимать таким образом, что выбранное пролекарство-кандидат $[C_x-OP]_y-D$ содержит то же лекарственное средство D, которое присутствует в пролекарстве GP-D, которое, как установлено, превращается по меньшей мере на 50% в D в определенных условиях. Необязательно, лекарственное средство D связано с олигопептидным фрагментом OP таким же образом, как оно соединено с дипептидом GP в пролекарстве GP-D. Другими словами, положительный результат стадии (v) по идентификации пролекарства GP-D является показательным или позволяет предсказать положительный результат в отношении пролекарства-кандидата $[C_x-OP]_y-D$, где OP представляет собой пептид ALGP. Такая экстраполяция является оправданной ввиду большого количества результатов, описанных в настоящем документе, полученных для доксорубина в качестве пролекарства D.

Также способы, предусмотренные настоящим изобретением, включают способы скрининга пролекарств-кандидатов, имеющих общую структуру:



где С представляет собой копирующую группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10); в частности, ОР представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO: 1); D представляет собой лекарственное средство;

х представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y = 1$;

у представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если у больше 1, то по меньшей мере 1 ОР содержит копирующую группу; и

причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы, такой как самоуничтожающийся или самоустранимый спейсер, и при этом если у больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы; где указанный способ включает стадии:

(i) получения лекарственного средства D;
(ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с $[C_x-OP]_y$ с получением пролекарства $[C_x-OP]_y-D$; (iii) приведения пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ в течение 3-24 ч при 37°C в контакт с выделенными пептидазами CD10 и/или TOP и с выделенными пептидазами FAP и/или DPiV;

(iv) определения конверсии пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ в свободное лекарственное средство D; (v) идентификации по данным (iv) пролекарства $[C_x-OP]_y-D$, которое по меньшей мере на 50% превратилось в D; и

(vi) выбора $[C_x-OP]_y-D$, идентифицированного на стадии (v), в качестве пролекарства-кандидата.

В любом из вышеуказанных способов скрининга, относящихся к превращению пролекарства GP-D или пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ в лекарственное средство D, процент превращения, используемый для выбора пролекарства-кандидата в общем составляет от по меньшей мере 50 до 100% (например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%).

В любом из вышеуказанных альтернативных способах скрининга указанная копирующая группа С может представлять собой фосфоноацетильную группу. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения ОР в любом из вышеуказанных способов скрининга представляет собой пептид, минимальная длина которого составляет 4 последовательных аминокислоты (тетрапептид), а максимальная длина составляет 8 аминокислот (то есть пептид, имеющий длину 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот), и который содержит на карбоксиконце пролин, включая дипептид, выбранный из группы, состоящей из глицина-пролина (GP), аланина-пролина (AP) и лизина-пролина (KP); в более частном варианте тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) или KLKP (SEQ ID NO:10); в еще более частном варианте ОР представляет собой тетрапептид ALGP (SEQ ID NO: 1).

В любом из указанных выше альтернативных способов скрининга указанное лекарственное средство D может быть выбрано из группы, состоящей из доксорубина, майтансина, гелданамицина, паклитаксела, доцетаксела, камптотецина, винбластина, винкристина, виндезина, метотрексата, аминоптерина, амрубина или производного любого из них.

Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим емкость, содержащую пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению или содержащий композицию, содержащую такое пролекарство или его соль. Такой набор может дополнительно содержать, в той же емкости (содержащей пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению) или в одной или более отдельных емкостей, одно или более дополнительных лекарственных средств против рака, таких как антитела или их фрагменты (например, как описано выше). В качестве альтернативы, или в дополнение, такой набор может дополнительно содержать, в той же емкости (содержащей пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению) или в одной или более отдельных емкостей, один или более агентов, обращающих устойчивость к лекарственным средствам. Другие необязательные компоненты такого набора включают один или более диагностических агентов, способных определять успешность терапии, включающей пролекарство или его соль согласно настоящему изобретению; инструкции по применению; одну или более емкостей со стерильными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или разбавителями; одну или более емкостей с агентами для ADEPT-терапии и т. д.

Содержание всех ссылок, приведенных выше и далее, полностью включено посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Синтез N-копированных пептидных пролекарственных соединений 1. Синтез Fmoc-пептид-OH.

1.1. Синтез Fmoc-ALAL-OH.

Обеспечивали набухание смолы Fmoc-Leu-Wang (5 г, 1 экв.) в диметилформамиде (20 мл) в течение 30 мин. Удаляли флуоренилметилоксикарбонильную (Fmoc) группу путем обработки пиперидином (4 мл) в диметилформамиде (16 мл) в течение 3 мин, затем смолу фильтровали, после этого проводили такую же обработку в течение 3 и 7 мин. Смолу трижды промывали диметилформамидом (20 мл). Fmoc-Ala-OH (2 экв.) и 2-(6-хлор-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (2 экв.) солюбилизировали в диметилформамиде (20 мл), и добавляли N,N-диизопропилэтиламин (4 экв.). Полученную смесь предварительно активировали в течение 6 мин и добавляли к смоле. Далее смолу встряхивали в течение 60 мин и трижды промывали диметилформамидом (20 мл). Группу Fmoc удаляли путем обработки пиперидином (4 мл) в диметилформамиде (16 мл) в течение 3 мин, затем смолу фильтровали. Такую обработку повторяли дважды в течение 3 и 7 мин. Смолы трижды промывали диметилформамидом (20 мл). Этот же протокол повторяли для Fmoc-лейцин-OH (2 экв.) и Fmoc-аланин-OH (2 экв.).

После последнего присоединения смолу трижды промывали поочередно диметилформамидом (20 мл) и дихлорметаном (20 мл) и сушили. Полученный Fmoc-пептид отщепляли от смолы посредством раствора трифторуксусной кислоты/триизопропилсилан/вода (95:2,5:2,5 об./об./об.) (20 мл) в течение 2 часов. Растворитель упаривали. Полученный продукт осаждали в воде и фильтровали. Полученный Fmoc-пептид сушили посредством лиофилизации. MS (ES⁺): 609.3 [MH]⁺; чистота: 90% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

1.2. Синтез Fmoc-ALG-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.1, начиная со смолы Fmoc-Gly-Wang вместо смолы Fmoc-Leu-Wang и с добавлением Fmoc-Leu и Fmoc-Ala. MC (ЭР⁺): 482,2 [MH]⁺; чистота: 92 % (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

1.3. Синтез Fmoc-ALPF-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.1, начиная со смолы Fmoc-Phe-Wang вместо смолы Fmoc-Leu-Wang и с добавлением Fmoc-Pro, Fmoc-Leu и Fmoc-Ala. MC (ЭР⁺): 669 [MH]⁺; чистота: 98 % (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

1.4. Синтез Fmoc-ALAF-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.3, начиная со смолы Fmoc-Phe-Wang и с добавлением Fmoc-Ala; Fmoc-Leu и Fmoc-Ala. MC (ЭР⁺): 643 [MH]⁺; чистота: 90% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

1.5. Синтез Fmoc-AIG-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.1, начиная со смолы Fmoc-Gly-Wang вместо смолы Fmoc-Leu-Wang и с добавлением Fmoc-Ile и Fmoc-Ala. MC (ЭР⁺): 482,5 [MH]⁺; чистота: 60 % (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

1.6. Синтез Fmoc-KLG-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.1, начиная со смолы Fmoc-Gly-Wang вместо смолы Fmoc-Leu-Wang и с добавлением Fmoc-Leu и Fmoc-Lys (IvDde). MC (ЭР⁺): 744 [MH]⁺.

1.7. Синтез Fmoc-GPG-OH.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 1.1, начиная со смолы Fmoc-Gly-Wang вместо смолы Fmoc-Leu-Wang и с добавлением Fmoc-Pro и Fmoc-Gly. MC (ЭР⁺): 452 [MH]⁺.

2. Синтез конъюгатов пептид-доксорубицин.

2.1. Синтез NH₂-ALAL-доксорубицина.

Доксорубицин (1 экв.) солюбилизировали в диметилформамиде (10 мл). К полученному доксорубицину добавляли раствор Fmoc-ALAL-OH (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл), и доводили pH до 8 посредством N,N-диизопропилэтиламина. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре (КТ), и добавляли 2-(6-хлор-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл). Проверяли pH раствора, и повторно доводили его до 8-8,5. Раствор перемешивали при комнатной температуре и контролировали посредством ВЭЖХ. Если реакция была завершена, группу Fmoc удаляли путем обработки пиперидином (10% конечного объема) в течение 5 мин при КТ, и добавляли 10%-й лактатный буфер с pH 3 при 0°C. Полученную смесь помещали на колонку YMC. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. Полученный ALAL-доксорубицин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). MS (ES⁺): 912 [MH]⁺; чистота: 95% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

2.2. Синтез NH₂-Pro-доксорубицина и NH₂-Gly-Pro-доксорубицина.

Доксорубицин (1 экв.) солюбилизировали в диметилформамиде (10 мл). К полученному доксорубицину добавляли раствор Fmoc-Proline-OH (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл), и доводили pH до 8-8,5 посредством N,N-диизопропилэтиламина. Полученный раствор перемешивали при КТ, и добавляли 2-(6-хлор-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл). Проверяли pH раствора, и повторно доводили его до 8-8,5. Раствор перемешивали при комнатной температуре и контролировали посредством ВЭЖХ. Если реакция была завершена, группу Fmoc удаляли путем обработки пиперидином (10% конечного объема) в течение 5 мин при КТ, и добавляли 10%-й лак-

татный буфер с pH 3 при 0°C. Полученную смесь помещали на колонку УМС. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. Полученный Pro-доксорубицин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). Этому же протоколу следовали для Fmoc-Glycine-OH (1,2 экв.). P-Dox: MC (ЭР⁺): 641 [МН]⁺; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм). GP-Dox: MC (ЭР⁺): 698 [МН]⁺; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

2.3. Синтез конъюгата NH₂-ALGP-доксорубицин.

Pro-доксорубицин (1 экв.) солибилизировали в диметилформамиде (10 мл). К полученному доксорубицину добавляли раствор Fmoc-ALG-OH (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл), доводили pH до 8 посредством N,N-диизопропилэтиламина. Раствор перемешивали при КТ, и добавляли 2-(6-хлор-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат (1,2 экв.) в диметилформамиде (2 мл). Проверили pH раствора, и повторно доводили его до 8-8,5.

Раствор перемешивали при комнатной температуре и контролировали посредством ВЭЖХ. Если реакция была завершена, группу Fmoc удаляли путем обработки пиперидином (10% конечного объема) в течение 5 мин при КТ, и добавляли 10%-й лактатный буфер с pH 3 при 0°C. Полученную смесь помещали на колонку УМС. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. ALGP-доксорубицин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). MC (ЭР⁺): 882 [МН]⁺; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

2.4. Синтез NH₂-ALPF-доксорубина.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 2.1, с использованием Fmoc-ALPF-OH вместо Fmoc-ALAL-OH. MC (ЭР⁺): 971[МН]⁺; чистота: 97% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

2.5. Синтез NH₂-ALAF-доксорубина.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 2.1, с использованием Fmoc-ALAF-OH вместо Fmoc-ALAL-OH. MC (ЭР⁺): 947[МН]⁺ чистота: 96% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

2.6. Синтез NH₂-AIGP-доксорубина.

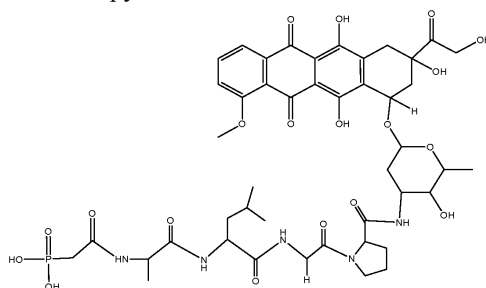
Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 2.1, с использованием Fmoc-AIGP-OH вместо Fmoc-ALAL-OH.

2.7. Синтез NH₂-GPGP-доксорубина.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 2.1, с использованием Fmoc-GPGP-OH вместо Fmoc-ALAL-OH.

3. Синтез PhAc-пептид-доксорубина.

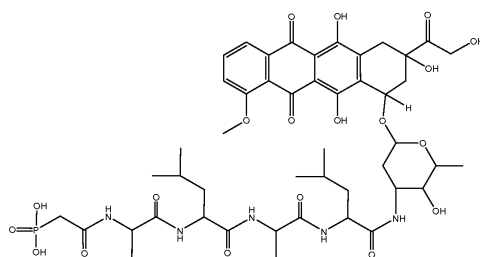
3.1. Синтез PhAc-ALGP-доксорубина



Соединение I

NH₂-ALGP-Dox (1 экв.) солибилизировали в диметилформамиде (10 мл). К полученному пептид-доксорубицину добавляли раствор фосфонуksусной кислоты (2,5 экв.) в диметилформамиде (2 мл), и доводили pH до 8 посредством N,N-диизопропилэтиламина. Раствор перемешивали при КТ, и добавляли 2-(6-хлор-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат (2 экв.) в диметилформамиде (2 мл). Проверили pH раствора, и повторно доводили его до 8-8,5. Раствор перемешивали при комнатной температуре и контролировали посредством ВЭЖХ. Если реакция была завершена, смесь осаждали диэтиловым эфиром и фильтровали. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. PhAc-ALGP-доксорубицин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). MC (ЭР⁺): 1004.4 [МН]⁺; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

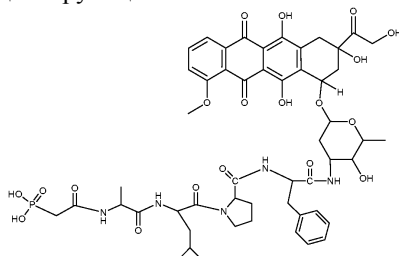
3.2. Синтез PhAc-ALAL-доксорубина



Соединение II

NH_2 -ALAL-Dox (1 экв.) солибилизировали в диметилформамиде (10 мл). К указанному пептид-доксорубину добавляли раствор фосфонуksусной кислоты (2.5 экв.) в диметилформамиде (2 мл), и доводили pH до 8 посредством N,N-диизопропилэтиламина. Раствор перемешивали при КТ, и добавляли 2-(6-хлор-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурион гексафторфосфат (2 экв.) в диметилформамиде (2 мл). Проверили pH раствора, и повторно доводили его до 8-8,5. Раствор перемешивали при комнатной температуре и контролировали посредством ВЭЖХ. Если реакция была завершена, смесь осаждали диэтиловым эфиром и фильтровали. Продукт выделяли посредством MeOH, и упаривали растворитель. PhAc-ALAL-доксорубин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). МС (ЭР^+): 1034 $[\text{МН}]^+$; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

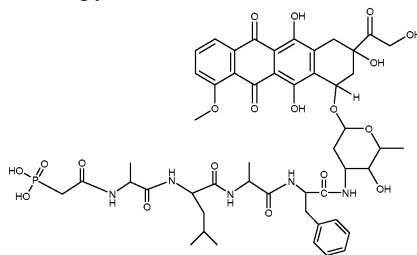
3.3. Синтез PhAc-ALPF-доксорубина



Соединение III

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -ALPF-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. МС (ЭР^+): 1094 $[\text{МН}]^+$; чистота: 92% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

3.4. Синтез PhAc-ALAF-доксорубина



Соединение IV

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -ALAF-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. МС (ЭР^+): 1068 $[\text{МН}]^+$; чистота: 97% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

3.5. Синтез PhAc-DLGP-доксорубина.

PhAc-D(Dmab)LGP-доксорубин получали согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -D(Dmab)LGP-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. Защитную группу Dmab, также известную как 4-{N-[1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексиден)-3-метилбутил]амино}бензил, удаляли посредством 2%-го гидразина гидрата в течение 5 мин при комнатной температуре. Добавляли 10%-й лактатный буфер с pH 3 при 0°C, и полученную смесь помещали на колонку YMC. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. Полученный PhAc-DLGP-доксорубин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). МС (ЭР^+): 1048,3 $[\text{МН}]^+$; чистота: 99 % (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

3.6. Синтез PhAc-TSGP-доксорубина.

PhAc-T(Dmab)SGP-доксорубин получали согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -T(Dmab)SGP-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. Защитную группу Dmab удаляли 2%-го гидразингидрата в течение 5 мин при комнатной температуре. Добавляли 10%-й лактатный буфер с pH 3 при 0°C, и полученную смесь помещали на колонку YMC. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. Полученный PhAc-TSGP-доксорубин очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). МС (ЭР): 1008,3 $[\text{МН}]^+$; чистота: 99 % (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

3.7. Синтез PhAc-AIGP-доксорубин.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -AIGP-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. МС (ЭР^+): 1004,3 $[\text{МН}]^+$; чистота: 99% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

3.8. Синтез PhAc-KLGP-доксорубин.

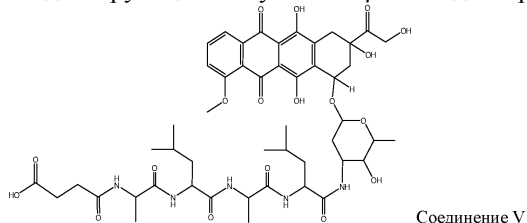
PhAc-K(IvDde)LGP-доксорубин получали согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH_2 -K(IvDde)LGP-Dox вместо NH_2 -ALAL-Dox. Защитную группу IvDde удаляли посредством 2%-го гидразина гидрата в течение 5 мин при комнатной температуре. Добавляли 10%-й лактатный буфер с pH 3 при 0°C, и полученную смесь помещали на колонку YMC. Полученный продукт выделяли посредством MeOH, и растворитель упаривали. Полученный PhAc-KLGP-доксорубин очищали

посредством полупрепаративной ВЭЖХ (колонка Luna, C18). МС (ЭР⁺): 1061 [МН]⁺; чистота: 91,5% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм).

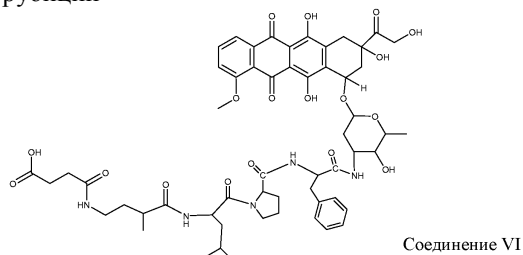
3.9. Синтез PhAc-GPGP-доксорубина.

Получение проводили согласно описанию, приведенному в разделе 3.2, с использованием NH₂-GPGP-Dox вместо NH₂-ALAL-Dox. МС (ЭР⁺): 974,9[МН]⁺; чистота: 98% (определена посредством ВЭЖХ при 214 нм). Для синтеза PhAc-TSGP-доксорубина и PhAc-KLGP-доксорубина использовали методики синтеза, аналогичные описанным выше.

4. Синтез сукцинил-βALAL-доксорубина и сукцинил-βALPF-доксорубина



Сукцинил-βALAL-доксорубин



Сукцинил-βALPF-доксорубин.

Сукцинил-βALAL-доксорубин и сукцинил-βALPF-доксорубин получали согласно описанию, ранее приведенному в источнике Fernandez AM et al., J. Med. Chem., 44:3750-3753 (2001).

Пример 2. Оценка стабильности N-кэпированных пептидных пролекарств в крови и плазме *in vitro*.

Методика.

Кровь и плазму человека, полученные от здоровых доноров, в цитратном буфере (pH 7, Innovative Research) использовали для оценки стабильности конъюгатов лекарственных средств, кэпированных фосфоацетилом (PhAc-ALAL-Dox, PhAc-ALPF-Dox, PhAc-ALAF-Dox, PhAc-ALGP-Dox, PhAc-DLGP-Dox и PhAc-KLGP-Dox) по сравнению со стабильностью известного пролекарственного конъюгата сукцинил-βALAL-Dox.

Конъюгаты лекарственного средства (50 мкМ) смешивали с плазмой человека и инкубировали в течение 5 часов при 37°C в водяной бане. Через 0, 1, 3 или 5 часов отбирали пятьдесят мкл образцов, и незамедлительно проводили экстракцию: к 50 мкл образцов добавляли 150 мкл ацетонитрила. Образцы перемешивали на устройстве типа "вортекс" и центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант собирали. Образцы обрабатывали буфером путем добавления 200 мМ формиатного буфера с pH 4,5 (1 об. супернатанта образца + 3 об. буфера), после чего подвергали анализу посредством ВЭЖХ (флуоресцентное детектирование возбуждение=235 нм, эмиссия=560 нм).

Результаты.

Аналогично Suc-βALAL-Dox, было показано, что все протестированные кэпированные конъюгаты стабильны в плазме и крови человека. Через 5 часов инкубирования при 37°C в присутствии крови или плазмы в тестируемых образцах было обнаружено 10% или менее метаболитических производных конъюгатов доксорубина (исключение: PhAc-ALAL-Dox, из которого было получено 15% метаболитов в крови; данные обобщены в таблицах 1 и 2).

Таблица 1

Соединения	% метаболитов, высвобожденных после 5 часов инкубирования при 37°C в крови человека в цитратном буфере						общий % метаболитов
	Dox	L-dox	AL-Dox	GP-dox	F-Dox	P-Dox	
Suc-βALAL-Dox	2	6	1	-	-	-	9
PhAc-ALAL-Dox	9	6	0	-	-	-	15
PhAc-ALPF-Dox	4	-	-	-	1	-	5
PhAc-ALAF-Dox	5	-	-	-	5	-	10
PhAc-ALGP-Dox	6	-	-	3	-	0	9
PhAc-DLGP-Dox	2	-	-	0	-	2	4
PhAc-KLGP-Dox	2	-	-	1	-	0	8
LGP-Dox	71			8			
GP-Dox	71						

Таблица 2

Соединения	% метаболитов, высвобожденных через 5 часов инкубирования при 37°C в плазме человека в цитратном буфере (pH7)						общий % метаболитов
	Dox	L-dox	AL-Dox	GP-dox	F-Dox	P-Dox	
Suc- β ALAL-Dox	<1	2	0	-	-	-	2
PhAc-ALAL-Dox	<1	2	0	-	-	-	2
PhAc-ALPF-Dox	0	-	-	-	0	-	0
PhAc-ALAF-Dox	0	-	-	-	2	-	2
PhAc-ALGP-Dox	2	-	-	0	-	0	2
PhAc-DLGP-Dox	2	-	-	0	-	1	3
PhAc-GPGP-Dox	6	-	-	0	-	0	6
PhAc-TSGP-Dox	4	-	-	4	-	0	8
LGP-Dox	63			2			
GP-Dox	50						

Пример 3. Оценка ферментативной активации N-кэпированных пептидных пролекарств *in vitro*.

1. Методика.

1.1. Исследование реактивации в присутствии пептидаз, секретируемых опухолевыми клетками

Субконфлюэнтные культуры опухолевых клеток LS-174T дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором, и добавляли свежую питательную среду (DMEM-F12 без фенолового красного), содержащую 0,02% бычьего сывороточного альбумина (100 мкл/см²). Через 24 часа инкубирования кондиционированную среду собирали, центрифугировали в течение 10 мин при 300 g, обрабатывали буфером 1 M Tris-HCl, pH 7,4 (1 объем буфера + 19 объемов среды) и концентрировали в 20 раз путем ультрацентрифугирования (пороговая отсечка 10 кДа). Лекарственные соединения (50 мкМ) инкубировали в течение 0, 1, 3 или 5 часов при 37°C в присутствии свежеприготовленной среды, кондиционированной опухолевыми клетками LS174T. В каждой временной точке отбирали по пятьдесят мкл образца, и проводили обработку, как описано выше для плазмы человека.

1.2. Исследование реактивации в присутствии очищенных ферментов (TOP, CD10, CD26, FAP).

CD10 (рекомбинантный человеческий неприлизин, R&D systems, номер по каталогу 1182-ZN) разбавляли до концентрации 20 нМ в 0,1 M MES с pH 6,5 с добавкой 0,2 мг/мл BSA. TOP (рекомбинантную человеческую тимет-олигопептидазу, R&D systems, номер по каталогу 3439-ZN) разбавляли до концентрации 10 нМ в растворе 50 mM Tris-HCl с pH 7,4/ 0,5 M NaCl/ 0,1 M DTT. CD26 и FAP разбавляли до концентрации 1 мкг/мл в буфере Tris-HCl с pH 7,5. Реакции инициировали путем добавления 50 мкМ каждого соединения к растворам ферментов (1 об. раствора фермента + 1 об. 100 мкМ раствора лекарственного средства). Образцы инкубировали в течение 0, 1 или 3 ч при 37°C в водяной бане в присутствии очищенных ферментов. В каждой временной точке отбирали по пятьдесят мкл образца, и проводили обработку, как описано выше для плазмы человека. Параллельно тестировали активацию Suc- β ALAL-dox для сравнения.

1.3. Результаты.

Результаты исследования реактивации конъюгатов N-кэпированный пептид-доксорубин *in vitro* представлены в табл. 3.

Suc- β ALAL-Dox расщепляли посредством CD10 с высвобождением 73% L-Dox. Напротив, PhAc-ALAL-Dox неэффективно расщеплялся посредством CD10. Через 3 ч инкубирования в присутствии фермента высвобождалось менее 5% L-Dox. В данном примере замена сукцинила- β A- кэпирующей группой фосфоноацетил ингибирует взаимодействие пептид-фермент. PhAc-ALAF-Dox умеренно расщеплялся посредством CD10 с получением F-Dox. Замена пептидного фрагмента ALAF на ALPF ингибирует расщепление посредством CD10, какую бы кэпирующую группу не использовали. PhAc-ALGP-Dox расщепляется посредством указанного фермента с получением LGP-Dox (через 3 часа инкубирования при 37°C высвобождалось 25% метаболита). PhAc-AIGP-Dox расщепляется посредством CD10 с получением IGP-Dox (18% гидролиза через 3 ч инкубирования). PhAc-DLGP-Dox и PhAc-GPGP-Dox, PhAc-KLGP-Dox и PhAc-TSGP-Dox либо не активировались, либо очень незначительно активировались посредством CD10.

TOP гидролизует Suc- β ALAL-Dox и PhAc-ALAL-Dox с высвобождением 64 и 44% AL-Dox, соответственно. Ни одно из производных ALAF-Dox и ALPF-Dox не расщеплялось посредством TOP.

TOP активирует PhAc-ALGP-Dox, PhAc-KLGP-Dox и PhAc-TSGP-Dox с получением GP-Dox (через 3 ч инкубирования в присутствии данного фермента было обнаружено 72, 31 и 38% метаболитов).

PhAc-DLGP-Dox, PhAc-GPGP-Dox PhAc-AIGP-Dox не расщеплялись посредством TOP.

Чувствительность кэпированных тетрапептидных Dox-пролекарств к TOP и CD10 не противоречит их стабильности в крови. Большинство пептидаз крови представляют собой экзопроteaseы, для которых указанные кэпированные тетрапептидные Dox-пролекарства недоступны в качестве субстратов. Тем не менее, TOP и CD10 представляют собой эндопротеазы, на которые присутствие кэпирующей группы не влияет.

Suc- β ALAL-Dox и PhAc-ALAL-Dox активируются ферментами, секретируемыми опухолевыми

клетками, с высвобождением L-Dox и в меньшей степени AL-Dox и Dox. PhAc-ALAF-Dox, PhAc-ALPF-Dox и Suc- β ALPF-Dox все активировались с получением F-Dox посредством ферментов, секретируемых опухолевыми клетками. PhAc-ALGP-Dox гидролизует в присутствии среды, кондиционированной опухолевыми клетками, с получением GP-Dox и Dox (через 5 ч обнаружено 56 и 24% всех метаболитов, соответственно), причем после активации PhAc-KLGP-Dox и PhAc-TSGP-Dox обнаружен в основном GP-Dox. PhAc-DLGP-Dox, PhAc-AIGP-Dox и PhAc-GPGP-Dox не активировались в присутствии пептидаз, секретируемых опухолевыми клетками LS174T.

Между защитными группами PhAc- и Suc- β A- для всех производных ALAL-Dox и ALPF-Dox значительных различий не было показано.

В данных экспериментах соединения PhAc-ALAL-Dox и PhAc-ALGP-Dox лучше расщепляются ферментами, секретируемыми опухолевыми клетками, и указанные соединения были выбраны для дальнейшего анализа *in vivo*.

Ни CD26, ни FAP не гидролизуют ни PhAc-ALGP-Dox, ни Suc- β ALAL-Dox, ни LGP-Dox, что согласуется с тем, что данные ферменты являются экзопротеазами/дипептидилпролинпротеиназами. Тем не менее, GP-Dox, является хорошим субстратом как для CD26 (97% превращения в Dox после 3 ч инкубирования при 37°C), так и FAP (62% превращения в Dox после 3 ч инкубирования при 37°C).

Культированные опухолевые клетки способны превращать PhAc-ALGP-Dox в GP-Dox, LGP-Dox в Dox и GP-Dox в Dox, что показывает наличие CD10 и/или TOP (PhAc-ALGP-Dox в LGP-Dox или GP-Dox), с одной стороны, и наличие CD26 и/или FAP (GP-Dox в Dox), с другой стороны. Это также подтверждает, что двустадийный процесс активации пролекарства протекает полностью за пределами клетки, то есть внутриклеточная (лизосомальная) обработка не требуется. Этот вывод противоположен выводу для L-Dox (высвобождаемому из Suc- β ALAL-Dox), который интернализируется и далее гидролизует с получением Dox внутри клетки.

Таблица 3

Соединения	CD10 10 нМ	% метаболитов, высвобожден- ных через 3 ч	TOP 5 нМ	% метаболитов, высвобожден- ных через 3 ч	LS174T CM20xcc	% метаболитов, высвобожден- ных через 5 ч
Suc- β ALAL-Dox	+	73 $\pm$ 17 L-Dox	+	64 $\pm$ 10 AL-Dox	+	65 $\pm$ 17 Dox +AL-Dox +L-Dox
Suc- β ALPF-Dox	-*	<5 F-Dox	-	0	+	17 $\pm$ 2 F-Dox
PhAc-ALAL-Dox	-*	<5 L-Dox	+	44 $\pm$ 6 AL-Dox	+	65 $\pm$ 19 Dox +AL- Dox+L-Dox
PhAc-ALPF-Dox	-	0	-*	<5 F-Dox	+	11 $\pm$ 6 F-Dox
PhAc-ALAF-Dox	+	24 $\pm$ 5 F-Dox+LAF- Dox	-*	<5 F-Dox	+	32 $\pm$ 15 F-Dox
PhAc-ALGP-Dox	+	25 $\pm$ 4 LGP-Dox	+	72 $\pm$ 14 GP-Dox	+	81 $\pm$ 31 Dox+GP- Dox+LGP- Dox
PhAc-DLGP-Dox	-	0	-	0	-	0
PhAc-AIGP-Dox	+	18 $\pm$ 3 IGP-Dox	-*	<5 GP-Dox	-*	3 $\pm$ 3 Dox+GP- Dox+IGP-Dox
PhAc-KLGP-Dox	-*	<5 LGP-Dox	+	31 $\pm$ 5 GP-Dox	+	39 $\pm$ 13 Dox+GP-Dox
PhAc-GPGP-Dox	-	0	-	0	-	0
PhAc-TSGP-Dox	-	0	+	38 $\pm$ 2 GP-Dox	+	35 $\pm$ 18 Dox+GP-Dox
LGP-Dox	-		-		+	Dox (23%) + GP-Dox (77%)
GP-Dox						Dox (28%)

* обнаружено менее 5% метаболитов.

Далее чувствительность GP-Dox (высвобождаемого из PhAc-ALGP-Dox посредством TOP) в качестве субстрата к активности пролилпептидаз была протестирована более подробно для двух таких ферментов, CD26 (синоним DPIV) и FAP выступают в качестве потенциально важных факторов для химиотерапии рака. CD26 (1 мкг/мл) или FAP не гидролизуют ни PhAc-ALGP-Dox, ни LGP-Dox (эффективно высвобождались из PhAc-ALGP-Dox посредством TOP), ни Suc- β ALAL-Dox. Тем не менее, было показано, что GP-Dox является хорошим субстратом для CD26 и FAP и расщеплялся с получением Dox (97% превращения посредством CD26; 62% превращения посредством FAP). Важно отметить, что в данном случае специфичность PhAc-ALGP-Dox к раковым клеткам увеличивалась. TOP задействована в процессе активации пролекарств Suc- β ALAL-Dox или PhAc-ALAL-Dox (с высвобождением AL-Dox) и PhAc-ALGP-Dox (с высвобождением GP-Dox). Несмотря на то, что AL-Dox в общем чувствителен к превраще-

нию в L-Dox и Dox путем секретируемых клетками пептидаз (и при этом L-Dox автоматически гидролизуетсЯ внутри клеток с получением Dox), GP-Dox, вероятно, чувствителен к пептидазам, преимущественно высвобождаемым опухолевыми клетками, таким как CD26 и FAP. Это различие в чувствительности и различие между ферментами, задействованными в активации GP-Dox с получением Dox (по сравнению с активацией AL-Dox с получением Dox), вероятно, приводят к различиям в токсичности и активности, например, PhAc-ALGP-Dox, с одной стороны, и Suc- β ALAL-Dox или PhAc-ALAL-Dox, с другой стороны. На основании изложенного и как описано в следующем примере, была оценена токсичность PhAc-ALGP-Dox *in vivo* в сравнении с PhAc-ALAL-Dox.

Пример 4. Оценка токсичности конъюгатов PhAc-ALGP-Dox и PhAc-ALAL-Dox *in vivo* после одной или множества внутривенных инъекций мышам.

Методика.

PhAc-ALAL-Dox и PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе. Соединения вводили путем внутривенной болюсной инъекции в латеральную хвостовую вену мышей OF-1 (10 мкл/г). Токсичность *in vivo* оценивали путем мониторинга массы тела.

Результаты.

Результаты, представленные на фиг. 1, демонстрируют высокую токсичность PhAc-ALAL-Dox в количестве 160 мкмоль/кг. В группе, получавшей лечение посредством PhAc-ALAL-Dox в количестве 80 мкмоль/кг, значительного снижения массы тела не наблюдалось. Инъекция PhAc-ALGP-Dox в дозах 240 и 320 мкмоль/кг хорошо переносилась. Умеренное снижение массы тела с максимумом в 15% на 28-й день было зафиксировано в группе, получавшей 240 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox, при этом была показана его меньшая токсичность по сравнению с PhAc-ALAL-Dox. Инъекция PhAc-ALGP-Dox в количестве 320 мкмоль/кг вызывала значительное снижение массы тела, и одна мышь была найдена мертвой на 12-й день. Эти данные показывают, что максимальная переносимая доза (MTD, англ.: maximum tolerated dose) PhAc-ALGP-Dox после одной в.в. болюсной инъекции составляет от 240 до 320 мкмоль/кг. Токсичность Dox изменяется от 30 и 40 мкмоль/кг, что показывает, что после одной внутривенной инъекции пролекарство PhAc-ALGP-Dox по меньшей мере в 6 раз менее токсично.

Пример 5. Исследование эффективности PhAc-ALGP-Dox после повторных в.в. болюсных инъекций на моделях с ксенотрансплантатом опухоли человека на бестимусных мышах.

Методика.

Противоопухолевую активность доксорубина и PhAc-ALGP-Dox исследовали на моделях на бестимусных мышах (nude/nude NMRI) с эктопическими ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки человека LS174T или карциномы молочной железы человека MX-1.

Опухоли LS174T и MX-1 прививали путем подкожной имплантации клеток (с введением 3×10^6 и 10^7 клеток, соответственно) в правый бок 6-недельных самок бестимусных мышей NMRI (Harlan). Лечение начинали, когда размер опухолей достигал 150-200 мм³ (рассчитывали по следующей формуле: [длина $\times$ ширина²]/2). В день первой инъекции животные были рандомизированно разделены на группы по 4 животных. Доксорубин и PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе. Доставку соединений осуществляли посредством внутривенной (в.в.) болюсной инъекции в латеральную хвостовую вену в объеме 10 мкл/г. В ходе эксперимента клинические признаки, массу тела и объем опухоли контролировали два раза в неделю. Результаты представлены в виде изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени. В качестве меры эффективности лечения применяли оптимальные значения T/C (отношение среднего объема опухоли у мышей, получавших лечение, к таковому у контрольных мышей). Оптимальное T/C в % отражает максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли (TGI, англ.: tumor growth inhibition) ($TGI = 100 - (T/C \times 100)$).

Результаты.

Как показано на фиг. 2, PhAc-ALGP-Dox вводили дважды (один раз в неделю) в.в. путем в дозах 140 мкмоль/кг и 160 мкмоль/кг бестимусным мышам с подкожно имплантированными опухолями LS174T (карциномы толстой кишки). Их массу тела и размер опухоли регистрировали в течение 28 дней и сравнивали с группами животных, получавших Dox (15 мкмоль/кг) и NaCl. Значительная и сходная противоопухолевая активность наблюдалась во всех группах, получавших лекарственные средства (табл. 4).

Эти данные также подтверждают более низкую токсичность PhAc-ALGP-Dox, так как в дозах 140 мкмоль/кг и 160 мкмоль/кг снижение массы тела (максимум на 10%) было сопоставимо со снижением массы, вызванным Dox в 9 раз меньшей дозе.

Таблица 4. Ингибирование роста опухоли. Средний относительный объем опухоли (RTV, англ.: relative tumor volume) и стандартное отклонение (SD) рассчитывали для каждой группы в конце исследования. Эффективность лекарственных средств выражали как процент ингибирования роста опухоли (% TGI), рассчитанный с применением уравнения $100 - (T/C \times 100)$, где T представляет собой средний RTV у мышей с опухолью, получавших лечение, а C представляет собой средний RTV в контрольной группе.

Соединение	PhAc-ALGP-Dox	PhAc-ALGP-Dox	Доксорубицин
Доза	140 мкмоль/кг	160 мкмоль/кг	15 мкмоль/кг
TGI [% (день)]	79 (28)	81 (28)	55 (28)

В другом эксперименте PhAc-ALGP-Dox вводили в.в. путем четыре раза (в 0-й, 3-й, 6-й и 9-й дни) в дозе 100 мкмоль/кг бестимусным мышам с подкожно имплантированными опухолями MX-1 (карциномы молочной железы). Их массу тела и размер опухоли регистрировали в течение 29 дней и сравнивали с группами животных, получавших Dox (8 мкмоль/кг) и NaCl. Для 2 исследованных лекарственных средств не наблюдалось значительного снижения массы тела и наблюдалась сходная значительная противоопухолевая активность (ингибирование роста опухоли > 60 %) (фиг. 3 и табл. 5).

Таблица 5. Ингибирование роста опухоли. Средний RTV рассчитывали для каждой группы в конце исследования. Эффективность лекарственных средств выражали как процент ингибирования роста опухоли (% TGI), рассчитанный с применением уравнения $100 - (T/C \times 100)$, где T представляет собой средний RTV у мышей с опухолью, получавших лечение, а C представляет собой средний RTV в контрольной группе.

Соединение	PhAc-ALGP-Dox	Доксорубицин
Доза	100 мкмоль/кг	8 мкмоль/кг
TGI [% (день)]	60 (29)	65 (29)

Пример 6. Фармакокинетический анализ и количественное определение в тканях PhAc-ALGP-Dox и его метаболитов после однократной в.в. болюсной инъекции мышам в сравнении с эквимоларной дозой доксорубина.

Методика.

Фармакокинетические исследования распределения в тканях проводили на мышах OF-1. Доксорубин и PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе в дозе 8,62 мМ и вводили мышам в.в. путем в латеральную хвостовую вену (10 мкл/г). В разные моменты времени после введения лекарственных средств (5 мин, 30 мин, 1 ч, 4 ч, 7 ч, 16 ч и 24 ч) 3 мышей из каждой группы умерщвляли путем смещения шейных позвонков и собирали кровь и ткани сердца. Сердца разрезали и тщательно промывали фосфатно-солевым буфером (для удаления крови из полости сердца), сушили на бумаге и замораживали в жидком азоте. Их хранили до проведения анализа. Образцы крови центрифугировали (10 мин, 2000 g, 4°C) для отделения фракции плазмы, которую хранили для анализа. Сердца гомогенизировали в 1,5 мл воды с применением гомогенизатора Ultra-Turrax. Концентрацию белка измеряли методом количественного определения белка microBCA (Pierce). Количественное определение препаратов в тканях проводили посредством ВЭЖХ после экстракции: 150 мкл ацетонитрила добавляли к 50 мкл образцов. Образцы перемешивали на устройстве типа "вортекс" и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант отбирали. Образцы забуферивали добавлением 200 мМ формиатного буфера с pH 4,5 (1 объем супернатанта образца + 3 объема буфера) перед анализом посредством ВЭЖХ (детекция флуоресценции при длине волны возбуждения 235 нм и регистрации эмиссии на 560 нм).

Результаты.

Доксорубин и PhAc-ALGP-Dox вводили путем в.в. болюсной инъекции в эквимоларной дозе, составляющей 86,2 мкмоль/кг, самкам мышей OF-1 дикого типа. Изменение концентрации лекарственных средств и их метаболитов в плазме и сердечной ткани определяли путем анализа посредством ВЭЖХ. Примерно 90 % концентрации лекарственных средств в плазме удалялись в течение первых пяти мин после инъекции Dox или PhAc-ALGP-Dox (фиг. 4А и В). Менее чем 1 % PhAc-ALGP-Dox подвергались быстрому гидролизу до LGP-Dox, GP-Dox и Dox. Эти метаболиты больше не обнаруживались через 1 час. Величина площади под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) в плазме для доксорубина после инъекции доксорубина была в 63 раза выше, чем после инъекции PhAc-ALGP-Dox (табл. 6).

Поскольку сердце представляет собой мишень для опасного токсического действия доксорубина, проводили определение концентрации свободного лекарственного средства в сердечной ткани. Также определяли AUC в сердечной ткани для доксорубина после введения доксорубина и AUC в сердечной ткани для Dox, GP-Dox и PhAc-ALGP-Dox после введения PhAc-ALGP-Dox (табл. 6). AUC в сердечной ткани для Dox после введения PhAc-ALGP-Dox была в 25 раз ниже, чем после введения Dox в эквимоларной дозе. С учетом клинического кардиотоксического эффекта Dox AUC эти результаты убедительно показывают, что PhAc-ALGP-Dox должен быть значительно менее кардиотоксичным, чем доксорубин.

Таблица 6. Значения фармакокинетического параметра AUC для PhAc-ALGP-Dox и его метаболитов по сравнению с доксорубином в сердечной ткани после однократной в.в. болюсной инъекции мышам OF-1 в дозе 86,2 мкмоль/кг.

AUC (площадь под кривой зависимости концентрации от времени)	Dox	PhAc-ALGP-Dox		
		Dox	GP-Dox	PhAc-ALGP-Dox
Плазма (мкМ·ч)	63	1	1	97
Сердце (пмоль·ч/мг белка)	5863	235	11	23

Пример 7. Анализ цитотоксичности PhAc-ALGP-Dox на кардиомиоцитах *in vitro*.

Анализ кардиотоксичности *in vitro* проводили на подходящей и предсказательной модели *in vitro* для скрининга на кардиологическую безопасность в процессе начальной оптимизации соединений-прототипов с применением кардиомиоцитов, полученных из эмбриональных стволовых клеток мыши (Cor.At®, Axiogenesis (Germany)). Кардиомиоциты Cor.At® обеспечивают стандартизированную, однородную и воспроизводимую клеточную систему для классификации кардио-цитотоксического потенциала соединений *in vitro*. После инкубации с исследуемыми соединениями применяли тест на поглощение красителя нейтрального красного для определения эффектов, непосредственно влияющих на жизнеспособность и целостность клеток сердца по сравнению с неспецифическими эталонными клетками, например, фибробластами эмбрионов мышей (MEF).

Результаты.

Кардиомиоциты Cor.At инкубировали в присутствии возрастающих концентраций PhAc-ALGP-Dox или доксорубина. Жизнеспособность клеток определяли через 48 ч с применением теста на поглощение красителя нейтрального красного. Фибробласты эмбрионов мышей (MEF) применяли в качестве контрольных клеток для отличия специфической кардиотоксичности от общей цитотоксичности. Кривая зависимости "доза-эффект" для PhAc-ALGP-Dox (фиг. 5) показывала наличие умеренного токсического действия исключительно на кардиомиоциты Cor.At при наибольшей исследуемой концентрации (20 мкг/мл). При этой концентрации действие на MEF было менее выраженным (жизнеспособность 81% по сравнению с жизнеспособностью 37%). В случае MEF не была достигнута концентрация IC₅₀ для этого соединения. При всех меньших исследованных концентрациях PhAc-ALGP-Dox не демонстрировал какого-либо токсического эффекта. Кривая зависимости "доза-эффект" для доксорубина показывала тяжелое токсическое действие на кардиомиоциты Cor.At, как и на MEF, при двух наибольших исследуемых концентрациях (20 мкг/мл и 2 мкг/мл). В концентрации 0,2 мкг/мл это соединение демонстрировало умеренное токсическое действие на кардиомиоциты Cor.At, но лишь незначительное действие на MEF (жизнеспособность кардиомиоцитов Cor.At 67% по сравнению с жизнеспособностью MEF 89%). Несмотря на то, что действие на кардиомиоциты Cor.At лишь немного превышало таковое на MEF, полагают, что соединение проявляет кардиотоксический эффект, который может быть замаскирован общим цитотоксическим эффектом.

Как показано на фиг. 5, это исследование демонстрирует, что PhAc-ALGP-Dox является в от 40 до 50 раз менее цитотоксичным, чем Dox, по отношению к кардиомиоцитам Cor.At®.

Пример 8. Оценка активации PhAc-ALGP-Dox в месте локализации опухоли после однократной в.в. болюсной инъекции бестимусным мышам с ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки LoVo.

Методика.

Активацию PhAc-ALGP-Dox в опухоли оценивали на бестимусных мышах (nude/nude NMRI) с эктопическими ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки человека LoVo. Опухоли LoVo прививали путем подкожной имплантации клеток (10⁷ клеток) в правый бок 6-недельных самок бестимусных мышей NMRI (Harlan). Лекарственные средства или контроли вводили через четыре недели после подкожной имплантации ксенотрансплантатов. В день инъекции животные были рандомизированно разделены на группы по 4 животных. Конъюгат PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе в возрастающих дозах (1,5, 3,5, 5, 10, 20, 30, 46, и 62 мМ). Доставку конъюгатов осуществляли посредством внутривенной (в.в.) болюсной инъекции в латеральную хвостовую вену в объеме 10 мкл/г. Через двадцать четыре часа после инъекции мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, и опухоли собирали, промывали в фосфатно-солевом буфере и гомогенизировали. Экстракцию лекарственных средств из гомогенатов опухолей проводили с применением ацетонитрила, и количество присутствующего в опухолях доксорубина определяли путем анализа посредством ВЭЖХ.

Результаты.

Представленные на фиг. 6 результаты показывают, что концентрация Dox в опухолях возрастала с увеличением вводимой дозы PhAc-ALGP-Dox, выходя на плато при значении 200 мкмоль/кг. Результаты этого примера указывают на то, что ограниченная скорость активации пролекарства и доступность в месте локализации опухоли может зависеть от максимальной ферментативной активности, достигаемой при взаимодействии с PhAc-ALGP-Dox.

Пример 9. Оценка токсичности PhAc-ALGP-Dox *in vivo* после однократной и многократных внутрибрюшинных инъекций мышам.

Методика.

PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе и вводили посредством однократной или многократных внутрибрюшинных (в.б.) инъекций в латеральную хвостовую вену мышей OF-1 (10 мкл/г).

PhAc-ALGP-Dox вводили в близких суммарных дозах, составляющих 280 и 560 мкмоль/кг, в соответствии с различными схемами введения: однократная в.б. инъекция; 5 последовательных ежедневных в.б. инъекций в дозах 56 и 112 мкмоль/кг или инъекции два раза в день в течение пяти последовательных дней в дозах 28 и 56 мкмоль/кг. Токсичность *in vivo* оценивали путем мониторинга массы тела.

Результаты.

Независимо от схемы введения снижение массы тела не было зарегистрировано в группах животных, получивших суммарную дозу PhAc-ALGP-Dox, составляющую 280 мкмоль/кг (фиг. 7). Исследование токсичности PhAc-ALGP-Dox после однократной в.б. инъекции в дозе 280 мкмоль/кг проводили отдельно, результаты на фигуре 7 не показаны. Доза 560 мкмоль/кг, введенная посредством однократной в.б. инъекции, была очень токсичной. Животные потеряли 25 % массы тела за одну неделю и были умерщвлены. Результаты явно указывают на то, что фракционирование дозы на многократные инъекции снижало токсичность. Пять последовательных ежедневных в.б. инъекций PhAc-ALGP-Dox в дозе 112 мкмоль/кг также вызывали значительное снижение массы тела с максимальным значением 22,5 % на 11-й день, но с последующей фазой восстановления. Снижения массы тела не наблюдалось в группе, получившей 10 в.б. инъекций (два раза в день в течение пяти последовательных дней) PhAc-ALGP-Dox в дозе 56 мкмоль/кг. Учитывая тот факт, что максимальная переносимая доза доксорубина, вводимая в соответствии с таким же режимом, составляет 3 мкмоль/кг, PhAc-ALGP-доксорубин является в этих условиях примерно в 15 раз менее токсичным.

Пример 10. Фармакокинетический анализ и количественное определение в тканях PhAc-ALGP-Dox и его метаболитов после однократной внутрибрюшинной инъекции мышам в сравнении с эквивалентной дозой доксорубина.

Методика.

Фармакокинетические исследования распределения в тканях проводили на мышах OF-1. Доксорубин и PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе в дозе 9,2 мМ и вводили мышам внутрибрюшинно (10 мкл/г, 6 мышей в каждой группе). В разные моменты времени после введения лекарственных средств (5 мин, 30 мин, 1 ч, 4 ч и 24 ч) собирали образцы крови из латеральной хвостовой вены трех мышей в микропробирки с ЭДТА (Starsted). Через 24 ч 3 мышей из каждой группы умерщвляли путем смещения шейных позвонков и собирали сердца. Последние разрезали и тщательно промывали фосфатно-солевым буфером (для удаления крови из полости сердца), сушили на бумаге и замораживали в жидком азоте. Их хранили до проведения анализа. Сердца гомогенизировали в 1,5 мл воды с применением гомогенизатора Ultra-Turrax. Концентрацию белка измеряли методом количественного определения белка microBCA (Pierce). Количественное определение лекарственных средств в ткани проводили посредством ВЭЖХ после экстракции: 150 мкл ацетонитрила добавляли к 50 мкл образцов. Образцы перемешивали на устройстве типа "вортекс" и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант отбирали. Образцы забуферивали добавлением 200 мМ формиатного буфера с pH 4,5 (1 объем супернатанта образца + 3 объема буфера) перед анализом посредством ВЭЖХ (детекция флуоресценции при длине волны возбуждения 235 нм и регистрации эмиссии на 560 нм).

Результаты.

Фармакокинетические свойства PhAc-ALGP-Dox в крови оценивали после внутрибрюшинной (в.б.) инъекции мышам OF-1. Небольшая процентная доля (примерно 1%) от введенной дозы достигала компартмента крови за первые пять мин после в.б. инъекции PhAc-ALGP-Dox в дозе 92 мкмоль/кг. Концентрация пролекарства в крови оставалась стабильной в течение одного часа и впоследствии снижалась. Конъюгат больше не обнаруживался через 4 ч (фиг. 8А). Значения AUC составляли 44,2 мкМ·ч и 3,6 мкМ·ч для PhAc-ALGP-Dox и Dox, соответственно. Представленные на фиг. 8В результаты показывают фармакокинетические свойства доксорубина в крови для его эквивалентной дозы. Небольшая процентная доля (примерно 2,5%) от введенной дозы достигала компартмента крови за первые пять мин после инъекции. Концентрация Dox в крови быстро уменьшалась в течение одного часа до очень низкой концентрации, которая оставалась стабильной не более 24 ч после инъекции. Значение AUC для доксорубина составляло 70,3 мкМ·ч.

Концентрацию доксорубина в сердечной ткани измеряли через 24 ч после в.б. инъекции PhAc-ALGP-Dox или доксорубина в эквивалентных дозах. Приведенные в табл. 7 результаты показывают, что доксорубин накапливался в 19 раз меньше после внутрибрюшинной инъекции PhAc-ALGP-Dox в дозе 92 мкмоль/кг, чем после инъекции доксорубина в эквивалентной дозе.

Таблица 7. Сердечная концентрация Dox *in vivo* после внутрибрюшинной инъекции Dox и PhAc-ALGP-Dox в дозе 92 мкмоль/кг. Мышей умерщвляли через 24 ч после введения лекарственных средств и сердца собирали. Концентрацию лекарственных средств определяли путем анализа посредством ВЭЖХ после экстракции из гомогенатов тканей. Результаты представлены в пмоль/мг белка $\pm$ SD (концентрации лекарственных средств и белка корректировали с учетом крови, оставшейся в тканях сердца).

Вид лечения	Концентрация Dox в сердце через 24 ч, пмоль/мг белка
Dox 92 мкмоль/кг	253 ± 60
PhAc-ALGP-Dox 92 мкмоль/кг	13 ± 3

Пример 11. Оценка эффективности PhAc-ALGP-Dox *in vivo* после повторных внутрибрюшинных инъекций на моделях с ксенотрансплантатом опухоли человека на бестимусных мышах.

Методика.

Эффективность PhAc-ALGP-Dox оценивали на бестимусных мышах (nude/nude NMRI) с эктопическими ксенотрансплантатами карциномы толстой кишки человека LoVo или карциномы молочной железы человека MX-1 по сравнению со свободным доксорубицином. Опухоли прививали путем подкожной имплантации клеток (10^7 клеток) в правый бок 6-недельных самок бестимусных мышей NMRI (Harlan). Лекарственные средства вводили, когда размер опухолей достигал 150-200 мм³ (измеряли с помощью калипера и рассчитывали по следующей формуле: [длина × ширина²]/2). Животные были рандомизированно разделены на группы по 4-6 животных. Доксорубицин и PhAc-ALGP-Dox растворяли в физиологическом растворе. Доставку соединений осуществляли посредством болюсной внутрибрюшинной (в.б.) инъекции в объеме 10 мл/г. В ходе эксперимента клинические признаки, массу тела и объем опухоли контролировали два раза в неделю. Результаты представлены в виде изменения среднего объема опухоли в зависимости от времени. В качестве меры эффективности лечения применяли оптимальные значения T/C (отношение среднего объема опухоли у мышей, получавших лечение, к таковому у контрольных мышей) и TGD (задержка роста опухоли до достижения объема 1000 мм³, англ.: tumor growth delay). Оптимальное T/C в % отражает максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли (TGI) ($TGI = 100 - (T/C \times 100)$). Статистический анализ проводили на 22-й день с применением t-критерия Манна-Уитни, программное обеспечение Graph Pad Prism 5.0.

Результаты.

Мыши с ксенотрансплантатами LoVo получали два раза в день (с интервалом 5-6 ч) в течение 5 последовательных дней (2Q1D5, всего 10 инъекций) внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора или доксорубицина в дозах 0,5, 1 и 2 мкмоль/кг или PhAc-ALGP-Dox в дозах 25, 35 и 50 мкмоль/кг. Регистрировали и сравнивали массу тела животных и размеры опухолей (фиг. 9). Измерения размера опухолей в группах, получавших NaCl и доксорубицин, прекращали при возникновении некроза опухолей. В этом эксперименте не было зарегистрировано значительного снижения массы тела. PhAc-ALGP-Dox вызывал дозозависимый противоопухолевый эффект и увеличение задержки роста опухоли (таблица 8). Умеренное ингибирование роста опухоли наблюдали в группе, получавшей доксорубицин в дозе 2 мкмоль/кг, тогда как никакой противоопухолевой активности не наблюдалось при дозах 0,5 и 1 мкмоль/кг. На 22-й день противоопухолевый эффект был статистически выше для дозы 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox по сравнению с 2 мкмоль/кг Dox при значениях TGI, составляющих 65 и 45%, соответственно. Абсолютную задержку роста, вызванную каждым видом лечения, рассчитывали как время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших лечение, вырастали в размере от 190 до 1000 мм³, минус время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших переносимую среду, достигали такого же размера. Схема лечения с введением 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox приводила к задержке роста, составляющей 17 дней, тогда как наибольшая доза свободного доксорубицина 2 мкмоль/кг вызывала задержку роста, составляющую лишь 6 дней.

Таблица 8. Ингибирование роста опухоли и задержка роста опухоли. Эффективность лекарственных средств выражена в процентном ингибировании роста опухоли (% TGI), рассчитанном по уравнению $100 - (T/C \times 100)$, где T представляет собой средний относительный объем опухоли (RTV) у мышей с опухолью, получавших лечение, а C представляет собой средний RTV в контрольной группе. Абсолютную задержку роста (TGD), вызванную каждым видом лечения, рассчитывали как время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших лечение, вырастали в размере от 190 до 1000 мм³, минус время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших переносимую среду, достигали такого же размера.

Соединение	PhAc-ALGP-Dox			Доксорубицин		
Доза (мкмоль/кг)	25	35	50	0,5	1	2
TGI [% (день)]	32 (22)	60 (22)	65 (22)	5 (22)	нет	45 (22)
TGD [дни]	5	13	17	1	0	6

В другом аналогичном исследовании (фиг. 10) лекарственные средства или контроли вводили в течение 2 последовательных недель (2Q1D5 × 2W; всего 20 инъекций). В этом случае результаты явно указывают на лучшую эффективность и более низкую токсичность PhAc-ALGP-Dox по сравнению с доксорубицином. В группах, получавших PhAc-ALGP-Dox, не наблюдалось значительного снижения массы тела (максимальное значение 13 % на 9-й день в группе, получавшей 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox). Однако дозозависимая токсичность была обнаружена в группах, получавших доксорубицин. Дозы 1,5 и 2 мкмоль/кг были очень токсичными и вызывали значительное снижение массы тела и гибель животных. Доза 1 мкмоль/кг была немного менее токсичной, но превышала MTD, поскольку наблюдалось непре-

рывное снижение массы тела (максимальное значение 15% на 29-й день), и одна мышь была найдена мертвой на 29-й день. В этой дозе доксорубицин обладал очень низкой активностью при значении TGI, составляющем 44% на 29-й день. Наибольшая эффективность была получена для 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox при значении TGI, составляющем 73 % на 29-й день, и значительной TGD, составляющей 22 дня (табл. 9).

Таблица 9. Ингибирование роста опухоли и задержка роста опухоли. Эффективность лекарственных средств выражена в процентном ингибировании роста опухоли (% TGI), рассчитанном по уравнению $100-(T/C \times 100)$, где T представляет собой средний RTV у мышей с опухолью, получавших лечение, а C представляет собой средний RTV в контрольной группе. Абсолютную задержку роста (TGD), вызванную каждым видом лечения, рассчитывали как время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших лечение, вырастали в размере от 190 до 1000 мм³, минус время в днях, в течение которого опухоли у мышей, получавших переносимую среду, достигали такого же размера.

Соединение	PhAc-ALGP-Dox			Доксорубицин		
Доза (мкмоль/кг)	25	35	50	1	1,5	2
TGI [% (день)]	54(29), n=5	53(29), n=5	73(29), n=5	44(29), n=4	65(29), n=1	-
TGD [дни]	9	9	22	5	9	-

Мыши с ксенотрансплантатами MX-1 получали с интервалом 72 ч 2 цикла в.б. инъекций длительностью 1 неделя каждый с введением 2 раза в день PhAc-ALGP-Dox в дозе 50 мкмоль/кг или доксорубицина в дозе 1 мкмоль/кг или 1,5 мкмоль/кг (2Q1D5 × 2W; всего 20 инъекций). Доксорубицин в дозе 1,5 мкмоль/кг был очень токсичным и вызывал значительное снижение массы тела и гибель животных. Для доксорубицина в дозе 1 мкмоль/кг (MTD) и для 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox не было зарегистрировано значительного снижения массы тела. Представленные на фиг. 11 результаты показывают, что PhAc-ALGP-Dox в дозе 50 мкмоль/кг значительно ингибировал рост опухоли и обладал улучшенной эффективностью по сравнению с дозой 1 мкмоль/кг доксорубицина (MTD). В конце исследования (на 35-й день) значения процентного ингибирования роста опухоли составляли 76 и 44% для PhAc-ALGP-Dox или для доксорубицина, соответственно (табл. 10). В этом исследовании во всех группах наблюдался некроз опухоли (мышей с некрозом опухоли выводили из исследования).

Эти эксперименты подтверждают, что PhAc-ALGP-Dox характеризуется в 25-50 раз меньшей токсичностью по сравнению с доксорубицином.

Таблица 10. Ингибирование роста опухоли и задержка роста опухоли. Эффективность лекарственных средств выражена в процентном ингибировании роста опухоли (% TGI), рассчитанном по уравнению $100-(T/C \times 100)$, где T представляет собой средний RTV у мышей с опухолью, получавших лечение, а C представляет собой средний RTV в контрольной группе.

Соединение	PhAc-ALGP-Dox	Доксорубицин	
Доза (мкмоль/кг)	50	1	1,5
TGI [% (день)]	76 (35), n=4	44 (35), n=3	Не определено

Пример 12. Оценка эффективности PhAc-ALGP-Dox после повторных внутрибрюшинных инъекций на модели легочной метастазирующей меланомы B16-F10 на мышах.

Методика.

Эффективность PhAc-ALGP-Dox исследовали на хорошо описанной модели легочной метастазирующей меланомы B16-F10. Для этой цели клетки меланомы мыши B16-F10 в количестве 5×10^7 вводили в латеральную вену мышам C57BL6. Лечение начинали через три дня после инъекции клеток. Животные получали два раза в день (с интервалом 5-6 ч) в течение 5 последовательных дней внутрибрюшинные инъекции (всего 10 инъекций/мышь) физиологического раствора или доксорубицина в дозах 2 и 3,5 мкмоль/кг или PhAc-ALGP-Dox в дозе 50 мкмоль/кг. Пять мышей из каждой группы умерщвляли на 14-й день после инъекции клеток. Легкие собирали и обрабатывали для количественного определения меланина (Molecular Pharmacology, 74: 1576-1586, 2008). Выживаемость определяли путем наблюдения состояния остальных мышей.

Результаты.

PhAc-ALGP-Dox значительно ингибировал образование легочных метастазов и увеличивал выживаемость мышей по сравнению с группами, получавшими NaCl и доксорубицин (фиг. 12). На 14-й день количество меланина в гомогенате легких составляло 501 мг/мл в контрольной группе, 183 и 53 мг/мл в группах, получавших 2 и 3,5 мкмоль/кг доксорубицина, и 16 мг/мл в группе, получавшей 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox. Медиана выживаемости составляла 20, 24, 28 и 36 дней в группах, получавших NaCl, 2 и 3,5 мкмоль/кг доксорубицина или 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox, соответственно.

Пример 13. Оценка эффективности PhAc-ALGP-Dox in vivo после повторных внутрибрюшинных инъекций на ортотопической модели карциномы толстой кишки HCT116 на мышах.

Методика.

Клетки HCT116 вводили подкожно мышам SCID. После прививания ксенотрансплантатов последние вырезали и ортотопически имплантировали в слепую кишку других у-облученных самок мышей SCID с применением микрохирургических методов. На 12-й день после инъекции опухолевых клеток

мышь были рандомизированы в четыре группы по 16 животных. Они получали в течение 5 последовательных дней 2 ежедневные внутривентральные инъекции физиологического раствора, доксорубицина в дозе 2 мкмоль/кг и PhAc-ALGP-Dox в дозах 35 и 50 мкмоль/кг, соответственно. На 34-й день после инъекции клеток рака толстой кишки в слепую кишку животных умерщвляли, подсчитывали количество метастазов с помощью микроскопа и взвешивали первичные опухоли.

Результаты.

Результаты представлены на фигурах 15 и 16. Доксорубицин в дозе 2 мкмоль/кг оказался слишком токсичным для мышей SCID, и все животные умерли в течение 10 дней. PhAc-ALGP-Dox также был более токсичным для этих мышей по сравнению с другими исследованными моделями с ксенотрансплантами опухолей на животных, и 12 мышей выжили в течение 34 дней при дозе 35 мкмоль/кг, а 9 мышей выжили в группе, получавшей 50 мкмоль/кг.

Контрольная группа характеризовалась средней массой первичной опухоли, составляющей 0,88 г с SD = 0,41. Вторая группа, получавшая 30 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox, имела массу первичной опухоли, составляющую 0,69 г с SD = 0,25, тогда как группа, получавшая 50 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox, демонстрировала значительное снижение массы опухоли при результате 0,44 г с SD = 0,10.

Количество печеночных метастазов составляло, соответственно, 20 (SD = 33) и 24 (SD = 26) для контрольной группы и группы, получавшей 30 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox. Эффект PhAc-ALGP-Dox в дозе 50 мкмоль/кг был очень значительным при среднем количестве метастазов 1,78 с SD = 2,9.

Несмотря на то, что PhAc-ALGP-Dox не был полностью лишен токсичности, это пролекарство можно оставить по меньшей мере для лечения/предотвращения метастазов (например, печеночных метастазов карциномы толстой кишки), если оно не будет эффективным против самой первичной опухоли (например, карциномы толстой кишки) в нетоксичных концентрациях.

Пример 14. Оценка PhAc-ALGP-Dox-индуцированной лейкопении в сравнении с доксорубицином.

Лейкопенические эффекты PhAc-ALGP-Dox (35 мкмоль/кг в.б.) и доксорубицина (3,5 мкмоль/кг в.б.) сравнивали в двух независимых экспериментах. Мыши CD1 получали два раза в день внутривентральные инъекции лекарственных средств в течение пяти последовательных дней (всего 10 инъекций/мышь; 2×5 животных в каждой группе). Регистрировали изменение массы тела мышей. Собирали кровь из хвостовой вены в пробирки Microvettes с ЭДТА (Starsted) на 4-й, 11-й и 15-й дни после начала лечения. Проводили подсчет белых кровяных телец (WBC) с применением гематологического анализатора SCILvet abc. Увеличение или уменьшение WBC выражали в виде процента по отношению к WBC в 0-й день (100 %) для каждой мыши. На фиг. 13 представлены объединенные результаты двух исследований.

На фиг. 13A приведены средние значения и SD, отражающие изменение массы тела в двух группах, а на фиг. 13B - изменение количества белых кровяных телец в виде процента по отношению к WBC в 0-й день для каждой мыши. Эти результаты явно указывают на отсутствие токсичности в.б. дозы 35 мкмоль/кг PhAc-ALGP-Dox по сравнению с доксорубицином, введенным в 10 раз меньшей дозе. В группе, получавшей PhAc-ALGP-Dox, не наблюдалось лейкопенического эффекта и снижения массы тела. С другой стороны, в группе, получавшей доксорубицин, одна мышь была найдена мертвой на 11-й день, а также 3 мыши - на 15-й день. Доксорубицин вызывал умеренную или тяжелую лейкопению (в среднем - 43 % WBC на 15-й день) и снижение массы тела (в среднем - 15% на 15-й день).

Пример 15. Оценка PhAc-ALGP-Dox-индуцированной хронической кардиотоксичности.

Методика.

Хроническую кардиотоксичность PhAc-ALGP-Dox оценивали морфологически на мышцах, как описано ранее Бертаццолли и др. (Bertazzoli et al), 1979 (Cancer Treat Rep 63, 1877-1883). Самки белых мышей CD1 получали внутривенную болюсную инъекцию в хвостовую вену в объеме 10 мкл/г (6 мышей в каждой группе). Соединения вводили два раза в неделю, десять раз. Животных не подвергали лечению в течение 2 недель между первыми четырьмя инъекциями и шестью последними инъекциями для восстановления подавленной деятельности костного мозга. Величины лечебных доз PhAc-ALGP-Dox составляли: 13,8; 27,6; 55,2 и 82,8 мкмоль/кг. Доксорубицин в дозе 6,9 мкмоль/кг применяли в качестве эталона. Через три недели после последней инъекции животных вводили в глубокий наркоз путем внутривентральной инъекции нембутала (50 мг/кг) и обескровливали. Сердца аккуратно собирали, промывали 9% NaCl и фиксировали в 10% растворе формальдегида. Образцы обрабатывали для гистопатологического анализа (CITox Lab, France). Сердца обрезали, заливали парафином, готовили срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином перед микроскопическим исследованием. В ходе эксперимента массу тела контролировали перед каждой инъекцией или один раз в неделю.

Результаты.

В группах, получавших PhAc-ALGP-Dox, снижения массы тела не наблюдалось (фиг. 14). В конце лечения животные, получавшие доксорубицин, демонстрировали признаки слабости и пониженную двигательную активность. Умеренное снижение массы тела было зарегистрировано в группе, получавшей доксорубицин, с максимальным значением 8% на момент умерщвления.

Результаты микроскопической оценки кардиотоксичности представлены в табл. 11. Одна мышь из группы, получавшей доксорубицин, не была использована для микроскопического исследования вслед-

ствие преждевременной смерти (на 17-й день). У всех мышей, получавших 6,9 мкмоль/кг доксорубина, присутствовали микроскопические изменения сердца. Наблюдалась минимальная или небольшая вакуолизация миокарда, характеризующаяся наличием мелких прозрачных цитоплазматических вакуолей в мышечных волокнах, рассредоточенных в желудочках, перегородке и предсердиях. Ядра клеток мышечных волокон в желудочках и перегородке были увеличены у 3 мышей из 5. Кроме того, присутствовали атрофия и/или повреждения предсердного миокарда, особенно с левой стороны. Атрофия мышечных волокон предсердий и воспалительный инфильтрат были обнаружены у 4 мышей из 5, наряду с фибриновыми тромбами у 3 мышей из 5. У одной из этих мышей также присутствовали дегенерация/некроз мышечных волокон. Введение PhAc-ALGP-Dox не вызывало каких-либо патологических изменений сердца по данным микроскопического исследования при любых величинах дозы (т.е. вплоть до дозы, в 12 раз превышающей дозу доксорубина).

Таблица 11. Микроскопическая оценка PhAc-ALGP-Dox-индуцированной хронической кардиотоксичности на мышцах в сравнении с доксорубином

Лечение	NaCl	Доксорубин	PhAc-ALGP-Dox			
Доза (мкмоль/кг)	0	6,9	13,8	27,6	55,2	82,8
Количество мышей	6	5	6	6	6	6
Вакуолизация, мышечные волокна	0	5	0	0	0	0
Степень 1	0	4	0	0	0	0
Степень 2	0	1	0	0	0	0
Образование тромбов; предсердие	0	3	0	0	0	0
Степень 1	0	3	0	0	0	0
Атрофия; мышечные волокна	0	4	0	0	0	0
Степень 1	0	1	0	0	0	0
Степень 2	0	3	0	0	0	0
Дегенерация/некроз; миокард	0	1	0	0	0	0
Степень 1	0	1	0	0	0	0
Инфильтрация; сумма клеток	0	4	0	0	0	0
Степень 1	0	4	0	0	0	0
Увеличение ядер; мышечные волокна	0	3	0	0	0	0
Степень 1	0	3	0	0	0	0

Общий вывод: максимальная переносимая доза PhAc-ALGP-Dox, в зависимости от различных схем лечения и способа введения, была в от 6 до 16 раз менее токсичной, чем доза Dox, и значительно более активной на трех экспериментальных моделях опухоли (ксенотрансплантатах LS174T и MX-1 и модели легочной метастазирующей меланомы B16). PhAc-ALGP-Dox не вызывал лейкопению в активных дозах и не демонстрировал кумулятивной кардиотоксичности на модели на мышцах в дозе, эквивалентной 12-кратной MTD для доксорубина.

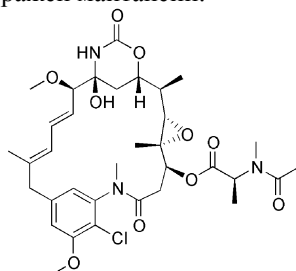
Пример 16. Синтез и оценка других токсичных соединений, конъюгированных с PhAc-ALGP.

1. PhAc-ALGP-майтансин.

Майтансин представляет собой высокоактивное соединение, нацеленное на микротрубочки, которое вызывает задержку митоза и убивает опухолевые клетки в субнанолярных концентрациях. Тем не менее, его побочные эффекты и отсутствие специфичности к опухолям являются препятствием для его успешного клинического применения. Он подавляет сборку микротрубочек, вызывая разборку микротрубочек и нарушает митоз. Майтансин демонстрирует цитотоксичность в отношении многих линий опухолевых клеток и демонстрирует примерно в 100 раз более высокую цитотоксичность, чем алкалоиды барвинка и примерно в 1000 раз более высокую цитотоксичность, чем доксорубин.

В клинических испытаниях токсичность в отношении желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы служили ограничителями дозы, тогда как миелосуппрессия была нечастой. При оценке в качестве монотерапии, майтансин не смог показать существенного ответа у пациентов с различными типами рака.

На нижеприведенной фигуре изображен майтансин:



Майтансин может быть конъюгирован с PhAc-ALGP посредством самоустранимого спейсера, реагирующего с его свободной группой -NH или OH. Майтансин коммерчески доступен (например, в компании Medkoo Biosciences; Xuzhou Kaiyide Chemical Co).

2. PhAc-ALGP-гелданамицин.

Гелданамицин и его производные представляют собой семейство бензохиноновых ансамицинов, антибиотиков, исходно выделенных на основании их слабой антибиотической активности, для которых впоследствии была показана сильная противоопухолевая активность. Гелданамицин индуцирует, по сравнению с их нормальными клеточными аналогами, предпочтительное разложение белков, которые являются мутированными в опухолевых клетках, таких как v-src, bcr-abl и p53. Данный эффект опосредован Hsp90. Несмотря на его высокий противоопухолевый потенциал, гелданамицин в качестве противоопухолевого агента имеет несколько значительных недостатков, что привело к разработке аналогов гелданамицина, в частности аналогов, содержащих замещение по положению 17.

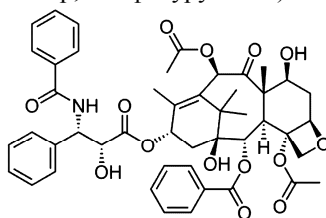


гелданамицин, дериватизированный по 17^{му} положению с получением 17AAG

В результате дериватизации гелданамицина по указанному положению получают 17AAG (17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин), который имеет меньшую токсичность *in vivo*, чем гелданамицин. Даже несмотря на то, что аффинность Hsp90 к 17AAG меньше, чем к гелданамицину, 17AAG и гелданамицин обеспечивают биологические эффекты в злокачественных клетках в аналогичных или одинаковых концентрациях. Гелданамицин с высокой аффинностью связывается с АТФ-связывающим карманом Hsp90. Hsp90 представляет собой распространенный молекулярный шаперон, имеющий критическое значение для укладки, сборки и активности нескольких мутированных и сверхэкспрессированных сигнальных белков, которые способствуют росту и/или выживанию опухолевых клеток. Связывание гелданамицина с Hsp90 вызывает дестабилизацию и разложение его мишени. Бюрке и др. (Burke et al.), 2009 (Bioorg Med Chem Lett 19, 2650-2653), описали методику связывания гелданамицина с антителами посредством линкера, расщепляемого лизосомальными ферментами. Данный линкер включает (самоуничтожающийся) фрагмент валин-аланин-п-аминобензиламино для обеспечения связывания с аминогруппой гелданамицина, с одной стороны, и со свободной аминогруппой антитела, с другой стороны. Такая же методика связывания может быть использована для получения PhAc-ALGP-гелданамицина, но после замещения в линкере дипептида валина-аланин на тетрапептид аланин-лейцин-глицин-пролин. Гелданамицин коммерчески доступен (например, в Calbiochem, Fermentec Biosciences, AG Scientific-Paclitaxel).

3. PhAc-ALGP-паклитаксел и PhAc-доцетаксел.

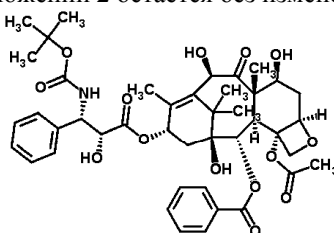
Таксаны представляют собой дитерпены, продуцируемые растениями *Taxus*. Они включают в себя паклитаксел (таксол) и доцетаксел (таксотер, см. фигуру ниже).



Паклитаксел или таксол

Паклитаксел представляет собой одно из нескольких действующих на цитоскелет лекарственных средств, мишенью которых является тубулин. Клетки, лечение которых производят с помощью паклитаксела, имеют дефекты, относящиеся к митотической сборке веретена, сегрегации хромосом и делению клеток. Паклитаксел стабилизирует полимер микротрубочек полимер, защищая его от деполимеризации, и тем самым блокирует митоз. Последние исследования показали, что подавление динамики происходит при более низких концентрациях, чем те, которые необходимы для блокирования митоза. При более высоких терапевтических концентрациях паклитаксел, как представляется, подавляет отсоединение микро-

трубочек от centrosом, процесс, в норме активируемый во время митоза. Паклитаксел одобрен для лечения рака яичников, рака молочной железы, рака легких и саркомы Капоши. Общие побочные эффекты включают тошноту и рвоту, снижение аппетита и гематологическую токсичность, такую как нейтропения, анемия и тромбоцитопения, хотя некоторые побочные эффекты связаны с используемым вспомогательным веществом, Кремофор EL (Cremophor EL), полиоксиэтилированным касторовым маслом. Доцетаксел или таксотер отличается от паклитаксела в двух положениях своей химической структуры. Это содержит гидроксильную функциональную группу при углероде в положении 10 (где паклитаксел содержит ацетатную эфирную группу), и на фенилпропионатной боковой цепи содержится трет-бутилкарбаматный эфир вместо бензиламида в паклитакселе. Замена функциональной группы при углероде в положении 10 обеспечивает то, что доцетаксел сильнее растворим в воде, чем паклитаксел. Гидроксильная группа при углероде в положении 2 остается без изменений.



доцетаксел или таксотер

Паклитаксел связывали с антителами посредством простой реакции (Guillemard & Saragovi 2001; Cancer Res 61, 694-699). Паклитаксел дериватизировали путем взаимодействия глутарового альдегида с получением 2'-глутарилпаклитаксела, содержащего расщепляемую сложноэфирную связь. Далее 2'-глутарил-паклитаксел активировали путем удаления гидроксильной группы посредством карбодиимида и связывали с антителом непосредственно через его аминогруппу с образованием пептидной связи. Эта методика была недавно использована (Garcia et al Oncogene 2012; doi: 10.1038/onc.2012.283) для связывания таксола с моноклональным антителом против герцептина. Результаты экспериментов показывают, что конъюгат активен в экспериментальных опухолях, что в свою очередь показывает, что лекарственное средство высвобождается *in vivo*.

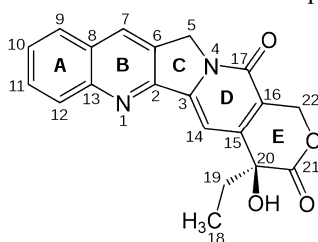
Паклитаксел также конъюгировали с антителами после сукцинирования паклитаксела по положению 2' и связывания с антителами посредством амидной связи (Safavy et al. 2003; Bioconj Chem 14, 302-310).

Похожие методы использовали для конъюгирования активированного 2'-глутарил- или 2'-сукцинилпаклитаксела с тетрапептидом PhAc-ALGP; в качестве альтернативы, использовали самоуничтожающийся спейсер, присоединенный по карбоксильной группе сукцинилпаклитаксела. Разумно ожидать высвобождение таксола из конъюгата PhAc-ALGP-паклитаксел *in vivo*, конечно, принимая во внимание, что тетрапептид является гораздо меньшей стерической преградой, чем антитела. Стабильность сукцинилсвязанного конъюгата пролекарства в крови может стать проблемой, учитывая эфирную природу сукцинильной группы паклитаксела. Поэтому может быть предпочтительным использовать самоуничтожающуюся группу между углеродом в положении 2' и тетрапептидом. Эти методы конъюгирования могут быть также применены к доцетакселу с учетом неизмененного углерода в положении 2'. Паклитаксел коммерчески доступен (например, в Hulsan Pharmaceutical, TradeIndia).

4. PhAc-ALGP-камптотецин.

Камптотецин (CPT; структура приведена ниже) представляет собой цитотоксический хинолиновый алкалоид, который ингибирует фермент ДНК-топоизомеразу I (TopoI). CPT показал заметную противораковую активность в предварительных клинических испытаниях, но ему присущи недостатки, заключающиеся в низкой растворимости и (сильной) нежелательной реакции на данное лекарственное средство. Из-за этих недостатков химики, специализирующиеся на синтезе и соединениях для медицины, разработали многочисленные способы синтеза камптотецина и его различных производных. В настоящее время были одобрены и используются в химиотерапии рака два аналога CPT: топотекан и иринотекан.

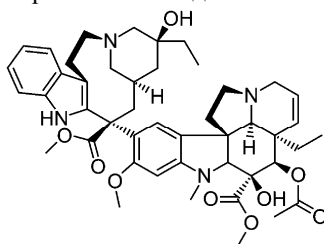
Исследования показали, что замещение в положении 7, 9, 10 и 11 может иметь положительный эффект на активность CPT и его физические свойства, например активность и метаболическую стабильность. Расширение лактонового кольца одним метиленовым звеном также повышает возможности CPT, как и гомокамптотецина. При замещении в положениях 12 и 14 образуются неактивные производные.



Бюрке и др. (Burke et al.), 2009 (Bioconjug Chem 20, 1242-1250), описали конструкцию и синтез конъюгатов антител и аналогов камптотецина. 7-Бутил-10-аминокамптотецин и 7-бутил-9-амино-10,11-метилendioксикамптотецин являются в 10-1000- раз более активными, чем камптотецин и могут быть связаны с антителами посредством пептидного линкера с самоустранивающимся спейсером, высвобождая лекарственные средства в присутствии лизосомальных ферментов. Для получения конъюгата камптотецина или его производного с PhAc-ALGP возможно применение аналогичной методики. Камптотецин коммерчески доступен (например, в Calbiochem, Seeboo Dhakhwa).

5. PhAc-ALGP-винбластин и PhAc-ALGP-винкристин.

Винбластин (структура изображена ниже) представляет собой направленное против микротрубочек лекарственное средство, применяемое для лечения некоторых видов рака, включая лимфому Ходжкина, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи и рак яичек. Он также используется для лечения гистиоцитоза клеток Лангерганса. Винбластина традиционно получают из растения *Catharanthus roseus*, также известного как винка розовая или мадагаскарский барвинок. Он образуется в растении путем соединения алкалоидов катарантина и виндолина.



В очень низких концентрациях он подавляет динамику микротрубочек, а в более высоких концентрациях он снижает массу полимеров микротрубочек. Распространенными побочными эффектами являются низкое число белых и красных кровяных телец в крови, и временно может снижаться количество тромбоцитов.

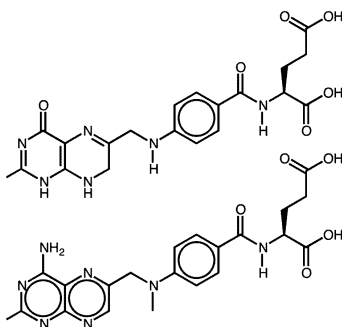
Винкристин является близким аналогом, отличающимся от винбластина только наличием СНО вместо CH_3 при N_1 . Несмотря на то, что винкристин очень похож на винбластин по структуре, он имеет другие терапевтические показания, а также вызывает очень серьезный побочный эффект. Основными показаниями для его применения являются неходжкинская лимфома, острый лимфобластный лейкоз, и он показан для лечения нефробластомы (опухоли Вильмса, опухоль почек, наиболее часто встречающаяся у маленьких детей). Основными побочными эффектами винкрестина являются периферическая нейропатия, гипонатриемия, запор и потеря волос. Периферическая нейропатия может быть тяжелой и может быть причиной того, чтобы избегать, уменьшить или прекратить применение винкрестина.

Конъюгаты PhAc-ALGP-винбластин или -винкристин могут быть получены путем связывания дезацетилвинбластина или -винкрестина посредством самоуничтожающегося спейсера, присоединенного по их углеродному атому C_4 .

Кандакури и др. (Kandukuri et al.), 1985 (J Med Chem 28, 1079-1088), разработали способ синтеза аминокислотных производных винбластина, в которых используется амидная связь с боковой цепью на карбоксильном конце аминокислоты. Данную связь получали путем смешанной ангидридной конденсации C_4 -деацетилвинбластина и N-малеоиламинокислот; винбластин-малеоилы C_4 аминокислот также конъюгировали с лактозаминированным сывороточным альбумином, и было показано, что они активны в отношении карциномы HepG2 (Rao et al. 1989; Anticancer Res 9, 973-979). Логически такая же методика применима к винкрестину. Конъюгирование винбластина или винкрестина с PhAc-ALGP также можно обеспечить с помощью этого метода. Последние конъюгаты имеют лучший профиль безопасности, чем неконъюгированный винбластин или винкристин, при сохранении противораковой активности. Винбластин коммерчески доступен (например, в Medkoo Biosciences), также как и винкристин (например, в Tocris Bioscience, Medkoo Biosciences).

6. PhAc-ALGP-метотрексат и PhAc-ALGP-аминоптерин.

Метотрексат представляет собой антиметаболит и антифолатное лекарственное средство. Его применяют для лечения рака и аутоиммунных заболеваний.



Сходство в структуре дигидрофолиевой кислоты (вверху) и метотрексата (внизу) предполагает, что метотрексат является конкурентным ингибитором дигидрофолиевой кислоты.

Метотрексат был первоначально разработан для химиотерапии, и его продолжают использовать для химиотерапии либо отдельно, либо в сочетании с другими агентами. Он эффективен для лечения ряда раковых заболеваний, включающих: рак молочной железы, рак головы и шеи, лейкоз, лимфому, новообразования легких, остеосаркому, новообразования мочевого пузыря и трофобластные новообразования. Наиболее распространенные нежелательные эффекты включают: язвенный стоматит, низкое содержание белых кровяных телец в крови и, следовательно, предрасположенность к инфекции, тошнота, боль в животе, усталость, лихорадка, головокружение и острую пневмонию.

Метотрексат, как полагают, действует на рак и ревматоидный артрит двумя различными путями. В случае рака, метотрексат аллостерически ингибирует дигидрофолатредуктазу (DHFR), фермент, который участвует в синтезе тетрафолата. Сродство метотрексата по отношению к DHFR примерно в 1000 раз больше, чем у фолата. DHFR катализирует превращение дигидрофолата в активный тетрагидрофолат. Метотрексат, следовательно, ингибирует синтез ДНК, РНК, тимидилатов и белков. В случае лечения ревматоидного артрита, ингибирование DHFR не считается основным механизмом, в то время как основными механизмами считаются ингибирование ферментов, участвующих в метаболизме пуринов, приводящее к накоплению аденозина, или ингибирование активации Т-клеток и подавление экспрессии молекулы межклеточной адгезии Т-клетками.

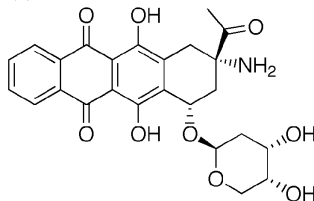
Умемото и др. (Umamoto et al.), 1989 (Int J Cancer 43, 677-684), описали способ связывания метотрексата через свободную карбоксильную группу с антителами посредством линкера Ala-Leu-Ala-Leu. Данный способ может быть аналогичным образом применен для связывания метотрексата с пептидом PhAcALGP и будет обеспечивать восстановление свободной карбоксильной группы после ферментативного расщепления. Производные по альфа-карбоксилатной группе являются относительно неактивными и нетоксичными *in vitro*, поскольку свободная альфа-карбоксилатная группа необходима для связывания метотрексата с DHFR.

Также были получены потенциальные пролекарства метотрексата, в которых 2-аминогруппа ацилирована альфа-аминокислотами (Smal et al. 1995; Biochemical Pharmacology 49, 567-574). Эти аминокислотные производные по 2-NH₂ птеридинового кольца метотрексата. Важно отметить, что производное 2-лейцилметотрексат быстро расщепляется и активируется в присутствии сыворотки, что иллюстрирует чувствительность к сывороточным экзопротеазам. Это делает правдоподобным то, что конъюгат PhAc-ALGP-метотрексат демонстрирует опухолеспецифичность противораковую активность. Связывание метотрексата с PhAc-ALGP производят посредством вышеописанной методики. Метотрексат является коммерчески доступным (например, CF Pharma Ltd, Yaskika Pharmaceuticals).

Аминоптерин (4-аминоптероевая кислота), 4-аминоаналог фолиевой кислоты, представляет собой антинеопластическое лекарственное средство с иммунодепрессивными свойствами. Аминоптерин представляет собой синтетическое производное птерина. Аминоптерин функционирует в качестве ингибитора ферментов путем конкуренции за фолатсвязывающий сайт фермента дигидрофолатредуктазы. Структура аминоптерина очень похожа на структуру метотрексата и он тоже содержит 2-NH₂ при его птеридиновом фрагменте. Аминоптерин был разработан до метотрексата, и его заменили последним в 1950-е из-за того, что его токсичность была больше, чем можно было ожидать от его большей активности. Большая эффективность была недавно подтверждена для лечения острого лейкоза (Cole et al. 2005; Clin Cancer Res 11, 8089-8096). Конъюгат PhAc-ALGP-аминоптерин может быть синтезирован способами, описанными для PhAc-ALGP-метотрексата, и повышенная специфичность данной противораковой активности в отношении опухолевых клеток аналогичным образом оправдана. Аминоптерин коммерчески доступен (например, в компании Cameo Chemicals, Sigma Aldrich).

7. PhAc-ALGP-Амрубицин.

Амрубицин (структура изображена ниже) представляет собой синтетический аналог антрациклина третьего поколения, который продемонстрировал существенную клиническую эффективность при лечении мелкоклеточного рака легкого. Амрубицин является мощным ингибитором топоизомеразы II и изучается в качестве монотерапии и в комбинации с противоопухолевыми терапиями в отношении различных солидных опухолей, в том числе опухолей легких и молочной железы. Амрубицин был отнесен FDA к категории орфанных лекарственных средств.



Амрубицин представляет собой антрациклин, имеющий структурные отличия от доксорубина. Тем не менее, он содержит NH₂-группу при его тетрациклиновом кольце. Побочные эффекты аналогичны побочным эффектам доксорубина, и они представляют собой такие эффекты как нейтропения и

тромбоцитопения. О хронической кардиотоксичности в качестве возможного побочного эффекта ничего не известно. Как указано для доксорубина, конъюгирование PhAc-ALGP с данным антрациклином применимо. Наличие PhAc-ALGP увеличивает селективность противораковой активности амрубицина в отношении опухолевых клеток. Амрубицин коммерчески доступен (например, в компании Medkoo Biosciences, Santa Cruz Biotech).

8. Общие стадии тестирования конъюгатов PhAc-ALGP-цитотоксичное соединение *in vitro* и *in vivo*.

Синтез производных будет основан на способах, в целом описанных выше и более подробно описанных в ссылочных публикациях, указанных для каждого цитотоксического соединения.

На первой стадии дипептид GP конъюгируют с цитотоксическим соединением, и разработана аналитическая методика для обнаружения и/или количественного определения конъюгата GP-цитотоксичное соединение, цитотоксичного соединения и промежуточных соединений между ними. Такая методология может включать одну или более из спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), масс-спектрометрии (MS), комбинированных ВЭЖХ и MS, ЯМР и MALDI-TOF (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация - время прохождения) или даже СЭЖХ-МС/МС (сверхэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией).

Очищенный конъюгат GP-цитотоксичное соединение тестируют *in vitro* в биологической системе для подтверждения его цитотоксичности. Для конъюгатов GP-цитотоксичное соединение с подтвержденной токсичностью осуществляют синтез полного конъюгата PhAc-ALGP-цитотоксичное соединение, и разработана аналитическая методика для обнаружения и/или количественного определения конъюгата PhAc-ALGP-цитотоксичное соединение, цитотоксичного соединения и промежуточных соединений между ними.

Несмотря на то, химический синтез и разработка аналитической методики, как ожидается, будет рутинной, может быть желательно изучить возможные модификации первоначально предусмотренного способа синтеза или разработать новый способ синтеза, такой как, например, способ синтеза с повышением выхода и/или чистоты конъюгата пептид-лекарственное средство.

9. Стадии исследования *in vitro*.

9.1. Биологическое исследование *in vitro* GP-конъюгата цитотоксичного соединения.

Цитотоксическая активность исходного соединения (неконъюгированного, "исходного" лекарственного средства) и его конъюгированного производного ("GP-лекарственного средства") будет исследована на клеточных линиях *in vitro*. Клеточные линии будут представлять собой по меньшей мере некоторые из упомянутых в указанных публикациях, приведенных выше в настоящем тексте для каждого из цитотоксических соединений. Необходимо проводить анализы в зависимости от концентрации лекарственного средства и времени инкубации. GP-лекарственное средство должно быть намного менее активным, чем исходное лекарственное средство, после коротких периодов инкубации. С увеличением времени инкубации эта разница может становиться менее значительной вследствие повышенного гидролиза GP-лекарственного средства под действием экзопротеаз, присутствующих в сыворотке, которая является частью инкубационной среды. В этом случае присутствие экзопротеаз в сыворотке может быть подтверждено, если это возможно, путем инкубации GP-лекарственного средства в бессывороточной инкубационной среде.

Более важным, однако, является анализ цитотоксичности GP-лекарственного средства до и после предварительной инкубации с очищенными пролилпептидазами FAP и/или DPV. По аналогии с GP-доксорубином, действие пролилпептидаз FAP и/или DPV на GP-лекарственное средство должно значительно увеличивать цитотоксичность за счет высвобождения свободного лекарственного средства. Если результаты этого анализа положительны, выполняют синтез PhAc-ALGP-лекарственного средства. Если результаты отрицательны, это может являться следствием недоступности для ферментов связи пролин-лекарственное средство. Решение этой проблемы может заключаться во введении спейсера с доступной концевой NH₂-группой между пролином и фрагментом лекарственного средства при условии, что такое производное сохраняет свой первоначальный цитотоксический эффект. Другим возможным решением будет введение самоуничтожающегося спейсера, который возвращает исходное лекарственное средство после гидролиза связи между конъюгатом лекарственное средство-спейсер и пролином. Один из возможных спейсеров этого типа представляет собой PABC или PAB (парааминобензилоксикарбонил), соединяющий фрагмент лекарственного средства с лигандом в конъюгате. Фрагмент линкера содержит пептидную последовательность, которая является субстратом для внеклеточного фермента, например, FAP, расщепляющего пептид по амидной связи. Пептид дополнительно содержит самоуничтожающийся фрагмент, который соединяет лекарственное средство и белковую последовательность пептида. При отщеплении пептидной последовательности под действием внутриклеточного фермента самоуничтожающийся фрагмент самостоятельно отщепляется от фрагмента лекарственного средства таким образом, что фрагмент лекарственного средства находится в неderivатизированной и активной форме.

9.2. Биологическое исследование *in vitro* PhAc-ALGP-конъюгата цитотоксичного соединения.

После получения удовлетворяющего требованиям GP-пролекарства проводят анализ биологических свойств *in vitro* для соответствующего PhAc-ALGP-конъюгата цитотоксичного соединения. Этот анализ включает оценку *in vitro* цитотоксического действия на клетки первоначального неконъюгированного

исходного лекарственного средства и его конъюгированного эквивалента-пролекарства. Сравнивают кривые зависимости "доза-эффект" для лекарственного средства и пролекарства. Ожидают, что пролекарство будет проявлять цитотоксичность, сопоставимую с таковой для неконъюгированного лекарственного средства.

Альтернативный эксперимент включает инкубацию PhAc-ALGP-пролекарства с очищенными CD10 и TOP и анализ конверсии в GP-пролекарство; после одновременной инкубации PhAc-ALGP-пролекарства с CD10, TOP, FAP и DPIV может быть проведен анализ степени конверсии PhAc-ALGP-пролекарства в свободное лекарственное средство. Значительно высокие уровни конверсии в GP-пролекарство и свободное лекарственное средство, соответственно, свидетельствуют о наличии цитотоксического эффекта PhAc-ALGP-пролекарства в клеточном/опухолевом окружении.

Обе описанные выше методологии также могут быть объединены: цитотоксичность по отношению к культивируемым *in vitro* клеткам продукта реакции PhAc-ALGP-пролекарства с очищенными CD10 и TOP или PhAc-ALGP-пролекарства с CD10, TOP, FAP и DPIV или обоих продуктов можно сравнивать с цитотоксичностью свободного лекарственного средства.

9.3. Фармакодинамический анализ GP-конъюгатов цитотоксического соединения и PhAc-ALGP-конъюгатов цитотоксического соединения *in vitro*.

Исследуют внутриклеточное поглощение (интенсивность поглощения) пролекарства до и после предварительной инкубации с протеазами, как описано выше. Для достижения этой цели может потребоваться введение подходящей метки в лекарственное средство и пролекарство (см. далее).

10. Стадии исследования *in vivo* PhAc-ALGP-конъюгата цитотоксического соединения.

10.1. Определение максимально переносимой дозы (MTD).

В исследованиях *in vivo* сначала определяют MTD конъюгата пролекарства путем измерения снижения массы тела мышей, которым вводят возрастающие дозы пролекарства. Эти результаты сравнивают с MTD свободного цитотоксического лекарственного средства. MTD определяют как дозу, которая вызывает снижение массы не более чем на 20 % от первоначальной массы животных.

На начальном этапе пролекарство и свободное лекарственное средство вводят в.в. путем 2 раза с интервалом 1 неделя, по возможности повторяют один или большее число раз. Исходя из описанного в настоящей заявке опыта с пролекарством доксорубина, активация пролекарства *in vivo* может быть очень низкой (медленной). В этом случае MTD определяют на нормальных мышах и мышах с ксенотрансплантатами опухолей человека после в.б. инъекций дважды в день 2 раза по 5 дней. Альтернативно, возможна медленная инфузия пролекарств с применением осмотических или других программируемых мининасосов.

Влияние пролекарств на количество белых кровяных телец сравнивают с влиянием свободного лекарственного средства.

10.2. Химиотерапевтическая активность на иммунодефицитных мышах с привитыми опухолями человека.

Выбирают одну или две различные модели с ксенотрансплантатами опухолей человека на основании опубликованных данных, полученных для неконъюгированного/свободного цитотоксического соединения. Пролекарство и свободное лекарственное средство вводят в.б. путем и определяют MTD, как описано выше. Массу тела и объем опухоли измеряют каждые два дня и сравнивают с результатами, полученными для свободного исходного лекарственного средства в его MTD.

Эту процедуру можно повторять на других типах опухолей человека, таких как лейкозы человека, на ортотопических ксенотрансплантатах опухолей человека на мышах SCID. Кроме наблюдения цитотоксического действия пролекарства и лекарственного средства на первичную опухоль, может быть определено влияние на метастазы.

10.3. Фармакокинетический анализ, распределение в опухоли и тканях PhAc-ALGP-конъюгатов цитотоксического соединения.

За исключением, наверное, флуоресцентного лекарственного средства, такого как амрубицин, фармакокинетические исследования распределения в тканях лекарственного средства и пролекарства могут потребовать введения подходящей метки в лекарственное средство и пролекарство для достижения достаточной чувствительности для химических аналитических способов определения. Один тип метки представляет собой радиоактивную метку; соединения могут, например, быть помечены радиоактивным изотопом путем обмена на тритий или неосинтеза с применением C-14 меченных предшественников. Введение метки должно быть таким, что метка, или метка сохраняется в метаболитах пролекарства. Исследуют фармакокинетические параметры в плазме, а также накопление в опухоли конъюгированного лекарственного средства и его метаболитов в сочетании с распределением в органах и тканях.

Пример 17. Эффективность PhAc-ALGP-доксорубина *in vivo* на модели с ксенотрансплантатом саркомы мягких тканей UZLX-ST3.

Из результатов эксперимента, представленных на фиг. 16-19, могут быть установлены несколько интересных свойств PhAc-ALGP-dox.

Объем опухоли.

В этом эксперименте эффект связывания доксорубина с пептидом ALGP оценивали путем исследова-

дования его активности в отношении устойчивой к доксорубину липосаркомы. Настоящие результаты демонстрируют, что связывание доксорубина с ALGP приводило к более высокой допустимой экспериментальной дозе. В связи с этим, даже в экспериментальной химиотерапии ксенотрансплантата устойчивой к доксорубину саркомы PhAc-ALGP-dox был способен ограничивать рост ксенотрансплантата указанной устойчивой к доксорубину липосаркомы. В этом исследовании группы мышей ($n = 4$ в обеих группах), в которых каждая мышь имела две опухоли, обрабатывали соответственно физиологическим раствором (контрольная группа), обрабатывали доксорубином (группа, получавшая доксорубин) и обрабатывали PhAc-ALGP-dox (группа, получавшая PhAc-ALGP-dox). Между 0-м днем и 21-м днем лечения как в контрольной ($n = 7$), так и в получавшей доксорубин ($n = 8$) группах мышей с опухолями наблюдали постоянный рост объема опухоли до 258% ($p = 0,018$) и 246% ($p = 0,012$), соответственно. С другой стороны, мыши с опухолью, получавшие PhAc-ALGP-dox, обнаруживали стабилизацию объема опухоли на уровне 105% (фиг. 16). Задержка роста объема опухоли у мышей, получавших PhAc-ALGP-dox ($n = 6$), была статистически значимой на 21-й день по сравнению с контрольной группой ($p = 0,003$) или с группой, получавшей доксорубин ($p = 0,002$).

Наблюдаемый эффект PhAc-ALGP-dox может отчасти быть объяснен непрерывным 7-дневным введением лекарственного средства через мининасос.

Второе и представляющее больший интерес объяснение заключается в вероятно более интенсивном высвобождении доксорубина в строме опухоли, чем после введения свободного доксорубина (который можно вводить лишь в значительно меньшей дозе).

Цитостатическое и цитотоксическое действие высвобожденного доксорубина на стромальные клетки может, в свою очередь, сильно влиять на рост раковых клеток. Это действие на стромальные клетки также может объяснить стабилизирующее влияние на объем опухолей в течение 21 дня без уменьшения их объема. Продолженное наблюдение после 21-го дня, возможно в сочетании с повторным введением с применением, например, различных переносящих сред, влияющих на высвобождение активного лекарственного средства, может синергически приводить к уменьшению объема опухоли (после разрушения всех опухолевых стромальных клеток).

Масса тела.

В течение всего эксперимента осуществляли мониторинг массы тела и общего состояния мышей. Подробный график, отображающий изменение массы тела, представлен на фиг. 17 (контрольная группа: $n = 4$; группа, получавшая PhAc-ALGP-dox: $n = 3$; группа, получавшая доксорубин: $n = 4$). Не наблюдалось серьезных побочных эффектов, и в целом масса тела животных не падала ниже допустимого значения (снижение массы во время лечения на 20% по отношению к исходной массе тела). Одна мышь из группы, получавшей PhAc-ALGP-dox, была умерщвлена по этическим причинам на 13 день (масса тела 79,8%, истощение животного с 11-го дня, во время вскрытия был обнаружен ограниченный асцит в брюшной полости, вероятно, из-за инфекции вследствие хирургической имплантации мининасоса).

Подсчет общего количества белых кровяных телец и подсчет общего количества нейтрофилов.

Существенных изменений общего количества белых кровяных телец и нейтрофилов у мышей, получавших PhAc-ALGP-dox, по сравнению с контрольными животными или животными, получавшими доксорубин (фигуры 18 и 19, соответственно; контрольная группа: $n = 4$; группа, получавшая PhAc-ALGP-dox: $n = 3$; группа, получавшая доксорубин: $n = 4$) не наблюдалось. Нейтропения представляет собой один из наиболее значимых токсических побочных эффектов от лечения свободным доксорубином. Таким образом, неизменное количество нейтрофилов через 21 день после введения PhAc-ALGP-dox доксорубина в дозе, в 40 раз превышающей дозу свободного доксорубина, является с клинической точки зрения весьма перспективным новым экспериментальным результатом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пролекарство, имеющее общую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу, при этом указанная кэпирующая группа С представляет собой фосфоацетильную группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой противоопухолевое лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y=1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и

причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

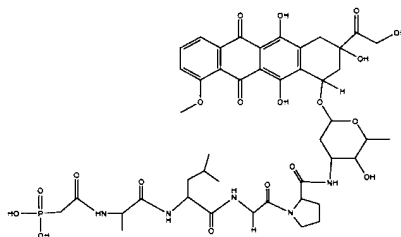
при этом, если y больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, и при этом по меньшей мере 1 ОР содержит кэпирующую группу С;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Пролекарство или его соль по п.1, где указанное лекарственное средство D представляет собой доксорубин, даунорубин, амрубин, винбластин, винкристин, калихеамицин, этопозид, этопозид фосфат, CC-1065, дуокармицин, KW 20 2189, метотрексат, метоптерин, аминоптерин, дихлорметотрексат, доцетаксел, паклитаксел, эпотион, комбретастатин, комбретастатина А4 фосфат, доластатин 10, доластатин 11, доластатин 15, топотекан, камптотецин, митомицин С, порфирамицин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, флударабин, тамоксифен, цитозинарабинозид, аденозинарабинозид, колхицин, галихондрин В, цисплатин, карбоплатин, митомицин С, блеомицин, мелфалан, хлорохин, циклоспорин А или майтансин.

3. Пролекарство или его соль по любому из пп.1-2, где указанное лекарственное средство D пегилировано.

4. Пролекарство или его соль по любому из пп.1-3, где указанное пролекарство представляет собой соединение I



5. Фармацевтическая композиция, содержащая пролекарство или его соль по любому из пп.1-4.

6. Применение пролекарства или его соли по любому из пп.1-4 для лечения рака.

7. Способ получения пролекарства по любому из пп.1-4, включающий стадии:

(i) обеспечения лекарственного средства;

(ii) связывания указанного лекарственного средства с кэпированным олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; и

(iii) очистки указанного пролекарства, полученного на стадии (ii);

где указанный олигопептидный фрагмент представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6).

8. Способ получения пролекарства по любому из пп.1-4, включающий стадии:

(i) обеспечения лекарственного средства;

(ii) связывания указанного лекарственного средства с олигопептидным фрагментом с последующим связыванием кэпирующей группы с олигопептидным фрагментом с получением пролекарства; и

(iii) очистки пролекарства, полученного на стадии (ii);

где указанный олигопептидный фрагмент представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6).

9. Способ выбора пролекарства-кандидата, имеющего общую структуру:



где С представляет собой кэпирующую группу, при этом указанная кэпирующая группа С представляет собой фосфоацетильную группу;

OP представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если y=1;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и

причем связь между С и OP и связь между OP и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

при этом, если y больше 1, множество фрагментов OP индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, причём по меньшей мере 1 OP содержит кэпирующую группу С;

где указанный способ включает стадии:

(i) обеспечения лекарственного средства D;

(ii) конъюгирования указанного лекарственного средства D с $[C_x-OP]_y$ с получением пролекарства $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) приведения каждого из лекарственного средства D и указанного пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ независимо в контакт с культивируемыми *in vitro* клетками; (iv) определения цитотоксичности лекарственного средства D и указанного пролекарства $[C_x-OP]_y-D$;

(v) идентификации по данным (iv) пролекарства $[C_x-OP]_y-D$ с цитотоксической активностью, сопоставимой с цитотоксической активностью лекарственного средства D; и

(vi) выбора пролекарства $[C_x-OP]_y-D$, идентифицированного на стадии (v), в качестве пролекарства-

кандидата.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство D представляет собой доксорубин, даунорубин, амрубин, винбластин, винкристин, калихеамицин, этопозид, этопозида фосфат, CC-1065, дуокармицин, KW 20 2189, метотрексат, метоптерин, аминоптерин, дихлорметотрексат, доцетаксел, паклитаксел, эпотилон, комбретастатин, комбретастатина А4 фосфат, доластатин 10, доластатин 11, доластатин 15, топотекан, камптотецин, митомицин С, порфирамицин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, флударабин, тамоксифен, цитозинарабинозид, аденозинарабинозид, колхицин, галихондрин В, цисплатин, карбоплатин, митомицин С, блеомицин, мелфалан, хлорохин, циклоспорин А или майтансин.

11. Набор для направленной доставки в опухоль, содержащий емкость, содержащую пролекарство или его соль по любому из пп.1-4 или композицию по п.5.

12. Пролекарство, имеющее общую структуру:



где С представляет собой копирующую группу, при этом указанная копирующая группа С представляет собой фосфоацетильную группу;

ОР представляет собой тетрапептид, имеющий последовательность ALGP (SEQ ID NO: 1), TSGP (SEQ ID NO: 4) или KLGP (SEQ ID NO: 6);

D представляет собой лекарственное средство;

x представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, если $y=1$;

y представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1; и

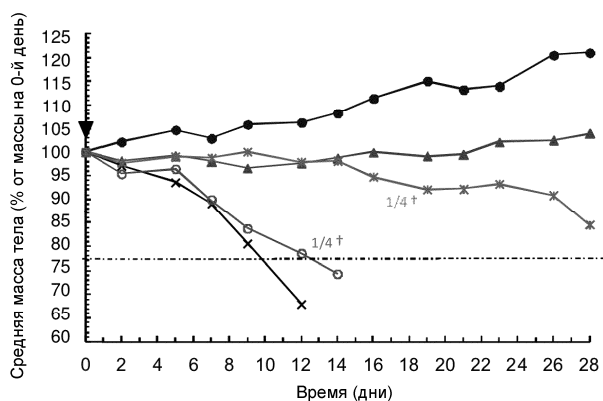
причем связь между С и ОР и связь между ОР и D являются непосредственными или осуществляются посредством линкера или спейсерной группы;

при этом, если y больше 1, множество фрагментов ОР индивидуально связаны друг с другом непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы и/или индивидуально связаны с D непосредственно или посредством линкера или спейсерной группы, и при этом по меньшей мере 1 ОР содержит копирующую группу С;

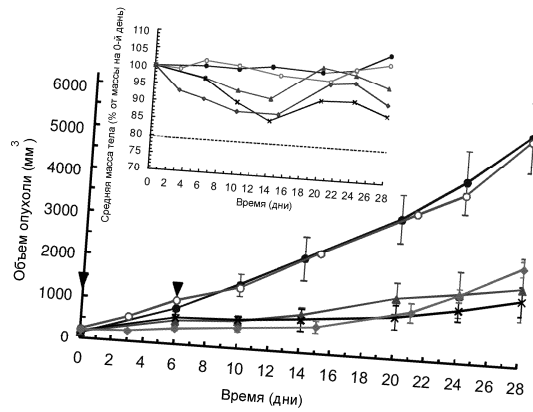
или его фармацевтически приемлемая соль,

причем указанное пролекарство предназначено для высвобождения лекарственного средства D в непосредственной близости к опухоли или опухолеассоциированным клеткам.

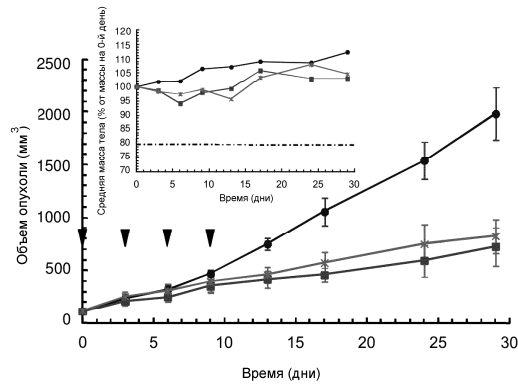
13. Пролекарство или его соль по п.12, где указанное лекарственное средство D представляет собой доксорубин, даунорубин, амрубин, винбластин, винкристин, калихеамицин, этопозид, этопозида фосфат, CC-1065, дуокармицин, KW 20 2189, метотрексат, метоптерин, аминоптерин, дихлорметотрексат, доцетаксел, паклитаксел, эпотилон, комбретастатин, комбретастатина А4 фосфат, доластатин 10, доластатин 11, доластатин 15, топотекан, камптотецин, митомицин С, порфирамицин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, флударабин, тамоксифен, цитозинарабинозид, аденозинарабинозид, колхицин, галихондрин В, цисплатин, карбоплатин, митомицин С, блеомицин, мелфалан, хлорохин, циклоспорин А или майтансин.



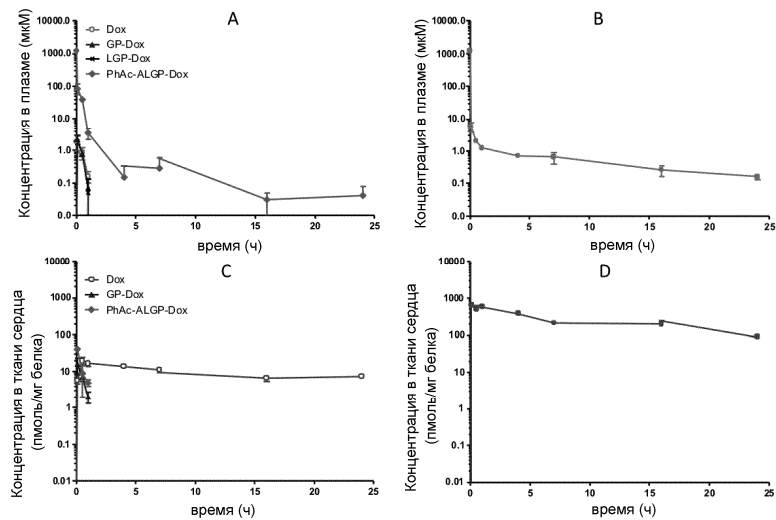
Фиг. 1



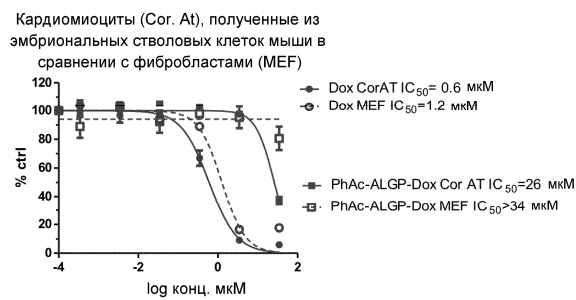
Фиг. 2



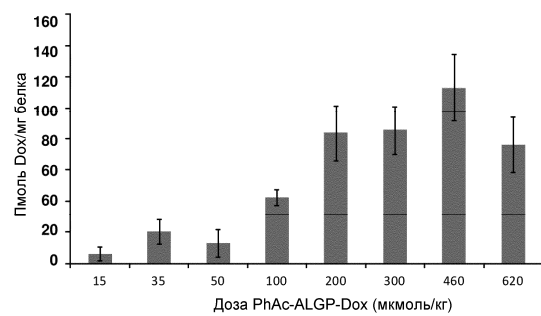
Фиг. 3



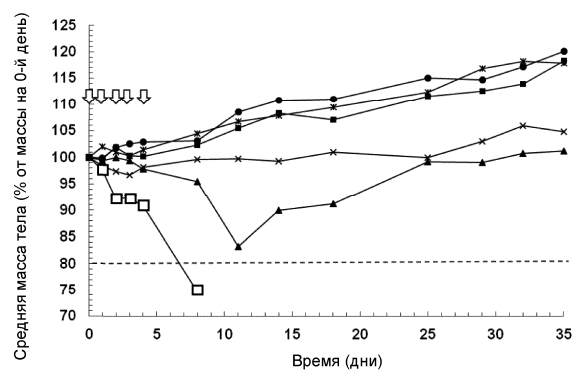
Фиг. 4



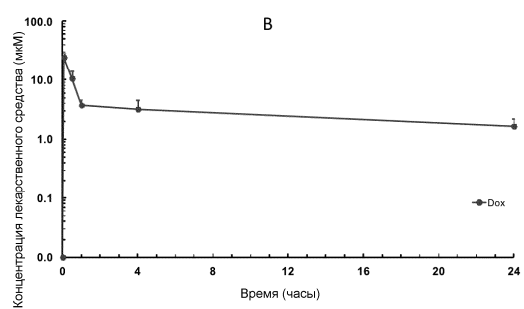
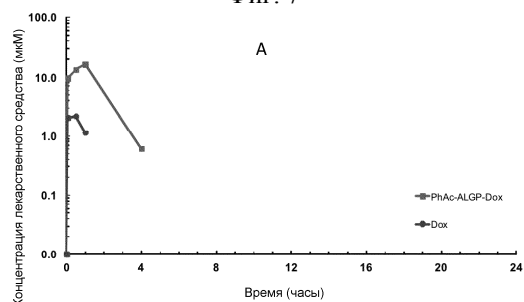
Фиг. 5



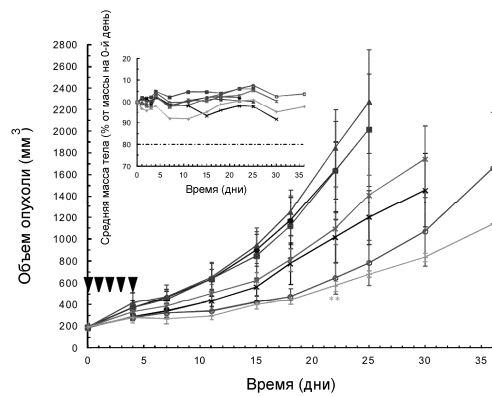
Фиг. 6



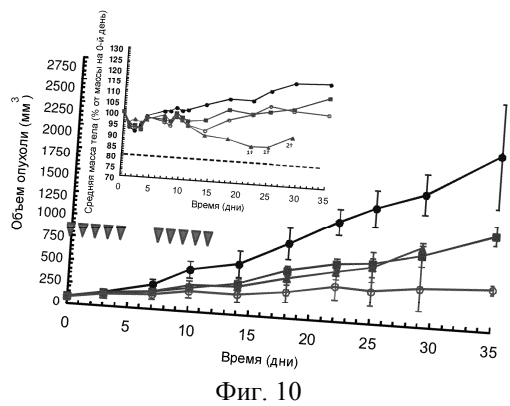
Фиг. 7



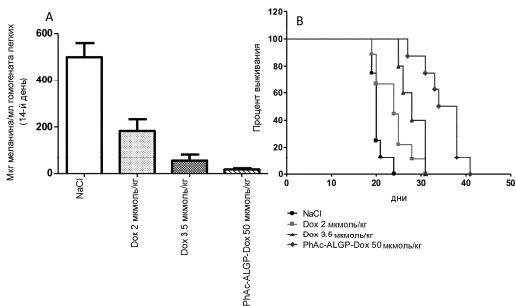
Фиг. 8



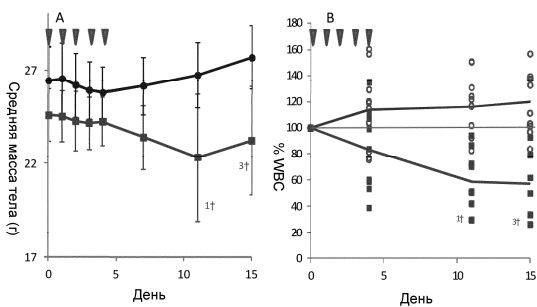
Фиг. 9



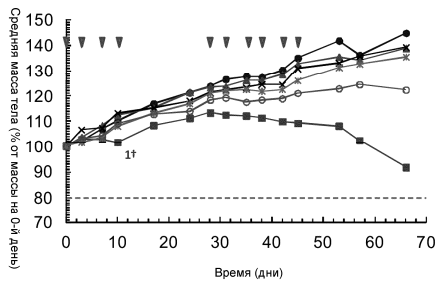
Фиг. 10



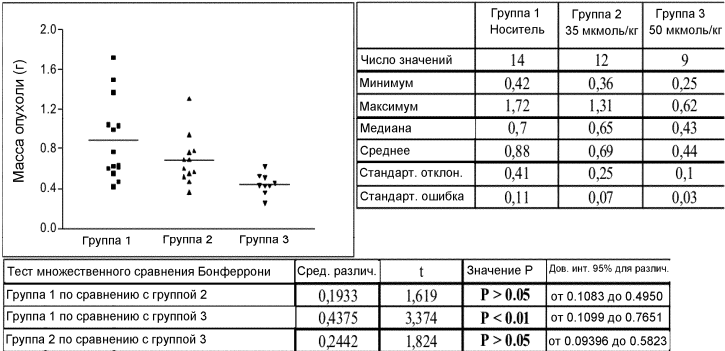
Фиг. 11



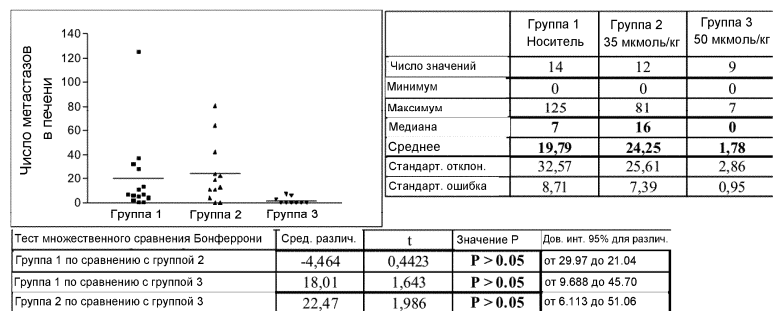
Фиг. 12



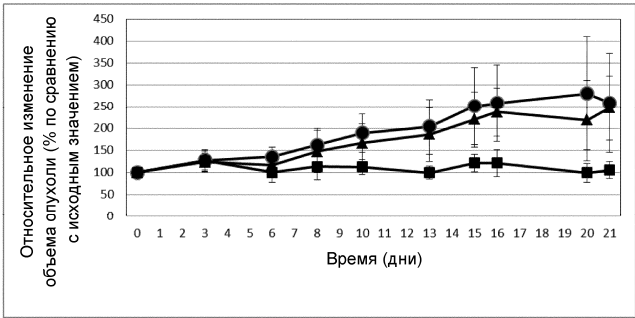
Фиг. 13



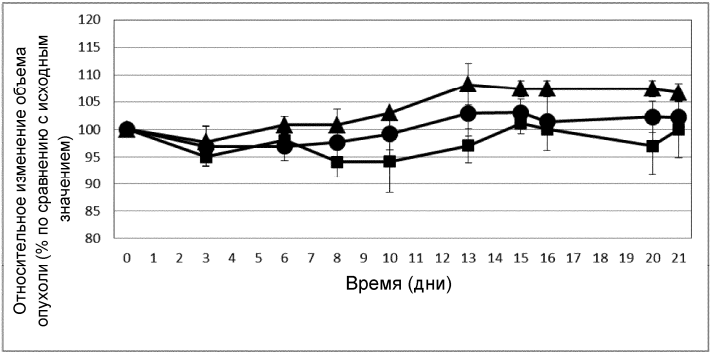
Фиг. 14



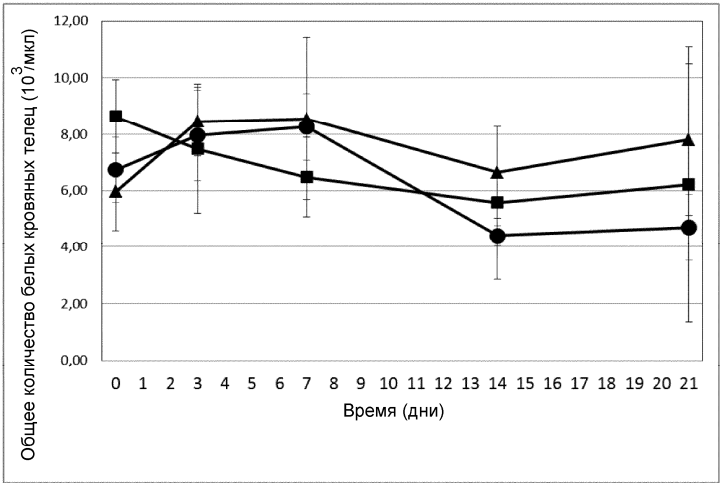
Фиг. 15



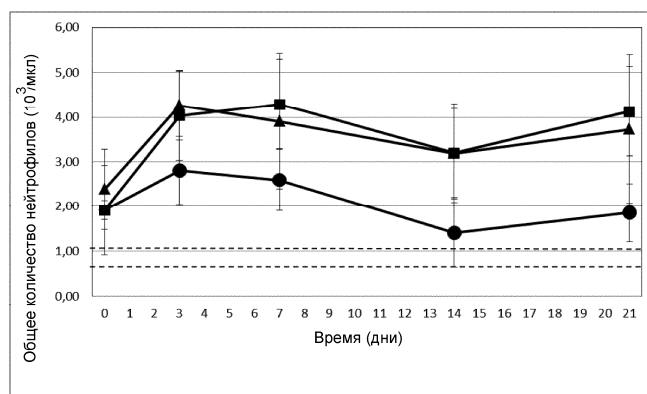
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2