

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036983**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.22

(21) Номер заявки
201692376

(22) Дата подачи заявки
2015.05.21

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

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

(31) 14169362.2

(32) 2014.05.21

(33) EP

(43) 2017.08.31

(86) PCT/EP2015/061258

(87) WO 2015/177279 2015.11.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АйСиДи-ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)**

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

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

(56) EP-A1-2100621

WO-A1-2010000713

KAI LICHA ET AL.: "Fluorescence Imaging with Multifunctional Polyglycerol Sulfates: Novel Polymeric near-IR Probes Targeting Inflammation", *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, vol. 22, no. 12, 21 December 2011 (2011-12-21), pages 2453-2460, XP055204924, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc2002727 abstract page 2454, left-hand column, paragraph 2

CHRISTOPHER SZENT-GYORGYI ET AL.: "Fluorogenic Dendrons with Multiple Donor Chromophores as Bright Genetically Targeted and Activated Probes", *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 132, no. 32, 18 August 2010 (2010-08-18), pages 11103-11109, XP055204989, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja9099328 page 11104

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей дендримерный конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃M⁺)_n]_m, где значения E, G, L, D, M, n, m определены в формуле изобретения, и к ее применению для лечения различных заболеваний.

B1

036983

036983

B1

Область изобретения

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

Уровень техники

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

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

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

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

В последнее время были разработаны новые фармацевтические способы для доставки терапевтических полипептидов, белков и антител в опухолевые клетки. Для внутриклеточной доставки терапевтических белков могут быть использованы фармацевтические наноносители, такие как липосомы, самособирающиеся мицеллярные системы или полимерные наночастицы (Du et al., Curr Drug Metab, 2012, 13, 82-92). Они способны устранить эндосомальный метаболизм, но не обладают специфичностью к опухолевой клетке. В связи с этим для нацеливания указанных наноносителей на опухолевые клетки могут быть использованы нацеливающие лиганды. Тем не менее, липосомальные и другие композиции в форме наночастиц, несущих терапевтические полипептиды, антитела и белки в сочетании с нацеливающими лигандами (van der Meel et al., Adv Drug Deliv Rev. 2013, 65, 1284-98), являются дорогостоящими и рассматриваются в качестве сложных химических соединений. Оптимизация этих структур часто осложня-

ется вследствие того, что зависимость между веществом носителя и терапевтической нагрузкой должна быть точно установлена. В отношении диагностических нагрузок физико-химические свойства диагностического агента должны быть точно приведены в соответствие с носителем аналогичным образом, чтобы получить функциональные химические соединения.

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

Решение задачи, лежащей в основе настоящего изобретения

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

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

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

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

Подробное описание изобретения

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

Объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы



где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу, выбранную из группы, состоящей из пептидов или пептидомиметических структур и белков,

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

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

где M представляет собой ион щелочного металла,

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

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

где m равно целому числу от 1 до 20,

где все дендримеры D указанного конъюгата имеют одинаковую молекулярную массу,

где количество n сульфатных групп является одинаковым для каждого дендримера D, и

где линкер L ковалентно связан с сердцевиной дендримера D в положении, из которого дендример растет с образованием своей дендритной структуры, и

где дендримеры $D(OSO_3^-M^+)_n$ обладают следующими соотношениями n и молекулярной массы:

количество ионов (n)	сульфат-	Молекулярная масса $D(OSO_3^-M^+)_n$ не превышает
6		2000 Да
8		2400 Да
12		4000 Да
16		5500 Да
18		6000 Да
24		8000 Да
30		10000 Да
32		11000 Да
36		12000 Да
40		13000 Да
48		16000 Да
72		24000 Да
96		32000 Да

и подходящий фармацевтический носитель и/или вспомогательное вещество.

Подразумевается, что полученный конъюгат не состоит из множества различных дендритных молекул, каждая из которых имеет другую структуру, ветвление, размер, заряд, объем или полярность, что является результатом полимерной природы. В WO 2011/095311 описано использование конъюгатов терапевтических белков с сульфатированными полиолами, где эти сульфированные полиолы имеют полимерную природу с молекулярной массой, отличной от определенной. Они характеризуются средней молекулярной массой, исходя из полидисперсности, статистической конъюгацией с терапевтическими молекулами. Было неожиданно обнаружено, что определенная система дендримеров (сульфатные группы 24, 32 или 48) с определенным линкером, конъюгированным с белком-токсиком, обеспечивает более высокую эффективность при лечении опухолевых клеток в культуре клеток по сравнению с полидисперсным полиглицеринсульфатом с сопоставимой средней молекулярной массой (см. пример 19).

Удивительно и неожиданно, еще одно преимущество использования определенных дендримерных систем с одной молекулярной массой по сравнению с полимерным сульфатированным полиглицерином может быть установлено в соответствии с настоящим изобретением. После мечения флуоресцентным красителем (ICC) с получением, например, соединения примера 8 (ICC-D01, ICC-D12, ICC-D18) проводили исследования клеточного захвата в сравнении с полимерным ICC-полиглицеринсульфатом (средняя молекулярная масса 12000 Да). ICC-D01, ICC-D12, ICC-D18 обеспечивали внутриклеточное распределение в цитозоле, при этом полимерный ICC-полиглицеринсульфат показал существенную локализацию дополнительно в эндосомальных компартментах, вероятно вследствие частичного эндоцитозного захвата полимерной смеси. Эндоцитозный захват для полимеров становится преобладающим выше 20 кДа, а также описан в WO 2011/095311 для сульфатированных полимеров. В общем случае захват терапевтических белков эндосомным компартментом требуется избегать по основным причинам. Во-первых, эндосомная мембрана представляет собой барьер для транслокации терапевтических эффекторных молекул к цитозолу. Обычно терапевтические эффекторные молекулы становятся недоступными при терапевтических целевых молекулах в цитозоле. Во-вторых, многие метаболизирующие и каталитические ферменты могут разрушать терапевтические эффекторные молекулы, прежде чем они могут быть транслоцированы в цитозоль. Этот аспект имеет особое значение для белковых терапевтических эффекторных молекул. Синтез полиглицеринсульфатов, включающий анионную полимеризацию с раскрытием цикла для синтеза полиглицеринового каркаса, известен из существующего уровня техники, обычно приводя к определенному молекулярно-массовому распределению около средней молекулярной массы M_n с индексом полидисперсности 1,5-1,8 (Gröger et al., *Bioconjug. Chem.* 2013, 24, 1507-14). Таким образом, для средней молекулярной массы M_n в диапазоне 5-10 кДа с индексом полидисперсности 1,5-1,8 всегда присутствует значительное количество высокомолекулярных структур (>20 кДа) в смеси, которые трудно поддаются

количественной оценке. Соответственно в примере 18 очевидная независимость от эндоцитоза является выраженной только для белковых конъюгатов с сульфатированными дендримерами (Asp-d02), а не для конъюгатов с полиглицерилсульфатом.

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

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

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

Предпочтительными агентами для проведения процесса сульфатирования гидроксильных групп являются комплексы триоксида серы (такие как SO₃-пиридиновый комплекс, SO₃-триэтиламинный комплекс, SO₃-триметиламинный комплекс, SO₃-ДМФ комплекс) или сульфаминовой кислоты (Mol JA et al., Carbohydr Res. 2003 338:1397-401).

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

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

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

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

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются дендримеры D с концевым 1,2,3,4,5-пентасульфатозвеном, производным сахаров, предпочтительно глюкозамина, дендримеры D с концевым 1,2-дисульфатозвеном, производным более мелких гидроксильных звеньев, включающих глицериновые структуры, дендримеры D с концевыми 1,3-дисульфатозвеньями, производными бис-(гидроксиэтил)алкильных фрагментов. Более предпочтительной в качестве структурного элемента в D является 1,2-дисульфатоалкильная структура на основе концевого 1-замещенного 1,2-дисульфатопропила, производного глицеринового звена.

В контексте этого варианта осуществления 1,2-замещенный глицерин означает что две смежные

гидроксильные группы образуют связь с последующим мономерным звеном оболочки следующей генерации в структуре дендримеров. 1,3-замещенный глицерин означает, что две внешние гидроксильные группы образуют указанное соединение.

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

В более конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, где линкер L ковалентно связан с сердцевиной дендримера D в положении, из которого дендример растет с образованием своей дендритной структуры, в результате чего из этой сердцевины выращивают дендример с образованием своей дендритной структуры.

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

Далее объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу, выбранную из группы, состоящей из пептидов или пептидомиметических структур и белков.

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

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

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

Более конкретно, нарушение внутриклеточных механизмов заболевания включает конъюгат сульфированных дендримеров и терапевтических молекул для использования в обработке клеток путем транспортировки конъюгата в клетку, и тем самым локализуя терапевтическую эффекторную молекулу E в клетке, где эта молекула E взаимодействует непосредственно с молекулярными механизмами заболевания. Это взаимодействие основано на прямом связывании с молекулами в клетке, индуцируя, таким образом, нарушение или изменения в биологических сигнальных путях. Связывание определяется связывающей силой или аффинностью связывания, которая зависит от молекулярной природы и структуры терапевтической эффекторной молекулы (что дополнительно показано в разделах ниже).

В более предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат сульфированных дендримеров и терапевтических молекул для применения при обработке клеток, которые имеют механизмы захвата, основанные на транспортных белках из группы трансмембранных транспортеров растворенных веществ, которые обеспечивают трансмембранную доставку терапевтически активных молекул посредством

трансмембранных транспортеров растворенных веществ в клетки. Эти трансмембранные транспортеры растворенных веществ предпочтительно содержат белки-транспортеры органических анионов (OATPs; Liu T et al., J. Drug Target. 2014,22, 14-22). Предпочтительным вариантом являются OATP с опухолеспецифичной экспрессией, включая OATP1B1, OATP1B3 или NTCP (Buxhofer-Ausch et al., J Drug Deliv. 2013, 863539).

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

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

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

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, где эффекторные молекулы выбраны из группы, включающей малые молекулы, пептиды, белки, гликаны, нуклеиновые кислоты. Предпочтительными являются эффекторные молекулы этих классов, которые не переносятся в клетки сами по себе.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, где малая молекула выбрана из группы, состоящей из пептидных или пептидомиметических структур, включая циклические или с открытой цепью пептиды с природными или неприродными структурными модификациями.

Было неожиданно показано, что гидрофильные пептиды, которые не захватываются клетками, могут локализовываться в опухолевых клетках после конъюгации с дендримерами по настоящему изобретению.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, где E направлен против молекул, вовлеченных в пролиферацию и апоптоз опухолевых клеток. Более конкретно, эти молекулы локализованы в опухолевой клетке, предпочтительно в пределах цитоплазмы опухолевых клеток.

В другом наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат, где эффекторная молекула представляет собой полипептид, который связывает мишени, выбранные из группы, состоящей из p19INK4D, GSK-3, мус, INK4A, p53, KRas, NRas, Hras, p27, KIP1, GSK3 beta, HER4, Src, PTEN, Bcl-2, Bcl-xL, mcl-1, Атаксина-1, катенина, IRAK1, IRAK2, IRAK4, VEGFR1, ZAP70, Aurora A, Aurora B и Aurora C.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где E представляет собой токсический полипептид, выбранный из группы, состоящей из дифтерийного токсина, дифтерийного токсина, лишённого рецептор-связывающей активности, экзотоксина синегнойной палочки A; процессированных форм экзотоксина синегнойной палочки, у которого отсутствует рецептор-связывающий домен Ia, токсин-рицина, сапорина, диантина, гелонина, трикозантина, противовирусного белка лаконоса (PAP), буганина, протективного антигена сибирской язвы, альфа токсина, абрина, апоптоз-индуцирующих полипептидов.

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где E представляет собой токсический полипептид, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I), дезоксирибонуклеазы II (ДНКазы II), полипептидов, нацеленных на альфа-тубулин, полипептидов, нацеленных на бета-тубулин, полипептидов, нацеленных на динеин, конъюгатов полипептидов, нацеленных на кинезин, полипептидов, нацеленных на NEDD1, полипептидов, нацеленных на трансформирующий кислый биспиральный белок TACC, полипептидов, нацеленных на сверхэкспресси-

рованный ген опухоли толстой кишки и печени chTOG.

В наиболее конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, где E представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из дикого типа p53, дикого типа p21, апоптоз-индуцирующего фактора 1 (AIF1), ASK1, апоптоз-индуцирующего белка (AIP), каспазы-2, каспазы-3, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, Вах, серин-протеазы, Smac, цитохрома c, Araf-1, апоптоина.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, где E направлен против молекул, участвующих в пролиферации и апоптозе опухолевых клеток.

Повышение уровня знаний о структурах токсинов и механизмах действия приводит к новым химическим соединениям, которые присутствуют в настоящее время в доклинических и клинических исследованиях. Большинство натуральных белков токсинов могут быть разделены на три основные группы: (1) токсины, которые повреждают клетки, нарушая целостность мембран, (2) токсины, которые нарушают нормальную электрическую активность нервного интоксигированного организма, (3) токсины, которые нарушают или препятствуют клеточным процессам и могут оказывать влияние на клетки-мишени посредством ферментативных или бесферментативных активностей. Некоторые члены третьей группы представляют собой чрезвычайно токсические полипептиды, которые обладают способностью самостоятельной транслокации в цитоплазму клетки, где они осуществляют свою активность, которая, в большинстве случаев, приводит к смерти клеток, подвергшихся интоксикации. Однако клиническое применение сконструированных токсинов до сих пор сталкивалось со многими проблемами. Две основные проблемы, связанные с системным введением иммунотоксинов, представляют собой (1) отсутствие специфичности вследствие присутствия целевого антигена/рецептора, также присутствующего на здоровой ткани, и (2) нежелательную интоксикацию здоровой ткани вследствие связывания иммунотоксина с компонентами клеточной поверхности, а не конкретно со своим целевым антигеном/рецептором ("токсичность, независимая от мишени"). Таким образом, в одном из вариантов осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$ с токсическими полипептидами или токсинами для лечения пролиферативного заболевания путем внутриклеточной доставки этих видов терапевтических эффекторов.

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

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

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

Таким образом, объект изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n]_m$, где E представляет собой альфа-спиральный пептид на основе белков сенсibilизации апоптоза, выбранных из группы, состоящей из BIM, BID, NOXA и PUMA.

Предпочтительными являются конъюгаты с m, равным 1. Предпочтительными являются синтетические пептиды, содержащие до 40 аминокислот, предпочтительно до 30 аминокислот, более предпочтительно до 20 аминокислот, образующих альфа-спираль в водном растворе. Альфа-спираль может быть стабилизирована за счет использования неприродных аминокислот в последовательности и/или путем формирования циклических пептидов (например, но ими не ограничиваясь, циклизация по типу "голова к хвосту", дисульфидная циклизация, углеводородная сшивка). Предпочтительные значения спиральности этих пептидов выше 40%, более предпочтительно выше 60%, еще более предпочтительно более 80%.

Настоящее изобретение также относится к удивительному открытию в отношении молекулярной массы терапевтических эффекторных молекул, в частности, из группы полипептидов или белков. Неожиданно было обнаружено, что сульфированные дендримеры, химически конъюгированные с антителами, фрагментами антител, или сконструированные белки обеспечивают внутриклеточную доставку в пролиферативные клетки, такие как опухолевые клетки. Антителами типа IgG являются белки со средней молекулярной массой 150 кДа и обычно неспособные проникать в цитоплазму. Степень внутриклеточно-

го захвата конъюгатов дендримеров с антителами исследовали на серии различных линий опухолевых клеток и определяли методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), а также методом флуоресцентной микроскопии. Было установлено, что уже через 3 ч после начала инкубации опухолевых клеток с конъюгатами дендримера с IgG присутствовал внутриклеточный захват. Количество положительных клеток, а также общая степень захвата повышалась при инкубации опухолевых клеток с конъюгатами дендримера с IgG в течение 24 ч. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что молекулярная масса терапевтических белков имеет решающее значение с точки зрения кинетики захвата. Более подробно, конъюгаты дендримеров с белком с общей молекулярной массой ниже чем 150 кДа демонстрируют быстрый внутриклеточный захват и более высокое относительное количество положительных клеток, чем полный IgG с молекулярной массой 150 кДа. Фрагменты антител, такие как (Fab)₂, ScFv-Fc или диатело, представляют собой белки со средней молекулярной массой 100-120 кДа. Наиболее активный внутриклеточный захват присутствует при конъюгатах дендримера с белком с молекулярной массой ниже 40 кДа, таким как однодоменные антитела (15 кДа). Специалист в данной области может определить степень внутриклеточного захвата опухолевыми клетками путем измерения методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией в различные моменты времени после начала инкубации (см. также пример 15).

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

В другом конкретном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где E включает полипептиды, которые содержат одну или несколько последовательностей ядерной локализации (NLS) в своей аминокислотной последовательности, которые, как известно, метят полипептид, обеспечивая таким образом перенос в ядро клетки с помощью ядерного транспорта, например, с использованием рецептора импорта. NLS известны специалисту в данной области (см. Lange и др., J. Biol Chem., 2007, 282, 5101-5) и обычно включают одну или несколько последовательностей катионных аминокислот (лизина, аргинина).

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где G представляет собой связывающую функциональную группу, образующую ковалентное присоединение между E и L, где G выбран из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(O), S(=O)₂, S(=O), S(=O)₂O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O)(O⁻M⁺)O, P(=O)(O⁻M⁺)O, арилена, этилена, этилена и триазиолилена.

Дополнительный объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где противоион M⁺ представляет собой ион натрия.

В другом варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где m соответствует количеству в диапазоне 1-20, описывая, что вариант осуществления включает одну или несколько систем сульфатированного дендримера-1 с линкером G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n, связанных с терапевтической эффекторной молекулой E, где дендримеры D(OSO₃⁻M⁺)_n обладают следующими соотношениями n и молекулярной массы:

Количество сульфатов-ионов (n)	Молекулярная масса D(OSO ₃ ⁻ M ⁺) _n не превышает
6	2000 Да
8	2400 Да
12	4000 Да
16	5500 Да
18	6000 Да
24	8000 Да
30	10000 Да
32	11000 Да
36	12000 Да
40	13000 Да
48	16000 Да
72	24000 Да
96	32000 Да

В соответствии со способами синтеза для получения гидроксильированных дендритных структур (полиоловые структуры), предпочтительным является определенное количество сульфатных групп, вы-

бранное из количества n , которое соответствует 6 или больше. Неожиданно было обнаружено, что высокосульфатированный дендример, связанный с фрагментом антитела (50 кДа, меченный флуоресценцией в диапазоне Су3 красителем ИСС, см. пример 8), обеспечивает в 3 раза более высокое обнаружение в опухолевых клетках с сульфатами в количестве 24 или 32 по сравнению с аналогичным конъюгатом с сульфатами в количестве 12 или 16. Однако при использовании небольшой эффекторной молекулы E (1200 Да) наблюдается аналогичный эффект с дендримером, содержащим 12 и 18 сульфатных групп.

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

Дополнительный объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат общей формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$ для лечения злокачественной опухоли.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат формулы $E-[G-L-D(OSO_3^-M^+)]_n$ для (i) лечения заболевания, выбранного из группы, включающей воспаление, аутоиммунное заболевание, метаболическое заболевание и фиброз, или (ii) антипролиферативного, пролиферативного, антиапоптотического, проапоптотического, антифиброзного, профиброзного, антилипогенного, антидиабетического, иммуностимулирующего и замедляющего старение лечения.

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

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

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

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

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

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

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

от формы среднего числа. Это среднее число может быть аналитически определено специалистом в данной области техники, например, методом ВЭЖХ или посредством фотометрического анализа.

В другом предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, где E включает тиол, посредством чего они представляют собой тиоловые группы внутреннего цистеина, которые обычно доступны путем восстановления дисульфидных связей. Тиолы предпочтительно метятся малеимидом (например, дендримеры d02, d03, d13, d14, d19, d20), образуя тиоэфир или пиридилдисульфид (например, дендримеры d04, d05, d15, d21), образуя дисульфид для G.

В предпочтительном варианте осуществления объект по настоящему изобретению представляет собой конъюгат в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m, в которой эффекторная молекула E на основе полипептидов или малых эффекторных молекул может быть синтетически модифицирована для введения реакционноспособных функциональных групп, которые не присутствуют в исходном полипептиде, которые не доступны или вызывают потерю функциональности E, когда соответствующая функциональная группа ковалентно конъюгирована с сульфатированными дендримерами, например, тиольных групп внутреннего цистеина, которые были получены путем восстановления дисульфидных связей. Примерами реакций полипептидов с введением функциональных групп, таких как тиол или азид, являются взаимодействия с 2-иминотиолоном, ацетилтиопропионовой кислотой, азидоалкилкарбонowymi кислотами, азидо-ПЭГ-алкилкарбонowymi кислотами и другими соединениями, известными специалисту в данной области техники (Bioconjugate Techniques; Greg T. Hermanson; Academic Press, 2008).

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

В объеме настоящего изобретения соединения в соответствии с формулой E-[G-L-D(OSO₃⁻M⁺)_n]_m демонстрируют цитотоксическое действие на опухолевые клетки, а также описаны во вспомогательных примерах. Этот эффект может быть количественно оценен посредством значения IC₅₀ в М [моль/л], которое указано для нескольких примеров. Соответственно объект по настоящему изобретению также относится к способу лечения заболевания, как описано выше, включающему применение конъюгатов сульфатированных дендримеров с терапевтическими эффекторными молекулами в соответствии с указанной формулой, демонстрируя значение IC₅₀ в культуре опухолевых клеток меньше чем 10⁻⁷М, предпочтительно меньше чем 10⁻⁸М, более предпочтительно меньше чем 10⁻⁹М. Следует понимать, что эта величина может отличаться в зависимости от используемой клеточной линии и метода анализа (который может представлять собой определение клеточной пролиферации, анализируемой с помощью ММТ-теста или подсчета живых клеток относительно мертвых клеток).

В числе группы белков, которые действуют в качестве связывающих реагентов и обычно применяются для блокирования взаимодействия по типу белок-белок, сконструированные полипептидные каркасы имеют вполне определенное значение. Полипептидные каркасы представляют собой полипептиды, имеющие жесткую природную полипептидную структуру, которая может быть использована для изменения существующего или обеспечения нового участка связывания для молекулярной мишени. Обычно такой каркас получают из устойчивого и небольшого растворимого мономерного полипептида (такого как ингибиторы Кунитца или липокалины) или из стабильно свернутого экстремембранного домена рецептора клеточной поверхности (например, белок А, фибронектин или анкириновый повтор). По сравнению с антителами или их рекомбинантными фрагментами эти полипептидные каркасы часто обеспечивают практические преимущества, включая повышенную стабильность и высокий выход продукта в микробиологических экспрессирующих системах, вместе с независимой ситуацией интеллектуальной собственности. Поскольку для достижения высокой активности связывания с мишенями эти связывающие полипептиды получают посредством биомолекулярного технологического процесса, к ним также могут применяться дополнительные схемы отбора, ориентированные на другие желаемые свойства (такие как растворимость, термическая стабильность, протеазная резистентность и т.д.). В течение последних 10-15 лет было предложено более 50 различных полипептидных каркасов. Самые современные подходы в этой области включают следующие полипептидные классы: (1) аффитела, производные Z-домена стафилококкового белка А, трехспиральный пучок из 58 остатков, обеспечивающих границу раздела на двух своих α-спиралях, (2) сконструированные домены Куниц-типа на основе небольшого (58 остатков каждый) и устойчивого ингибитора дисульфид-сшитой серин-протеазы, обычно человеческого происхождения (например LACI-D1), которые могут быть разработаны для различных специфичностей протеаз, (3) монотела или аднектины, основанные на 10-м внеклеточном домене фибронектина человека типа III (10Fn3), который принимает иммуноглобулин-подобную бета-складчатую структуру (94 остатка) с 2-3 открытыми петлями, но отсутствует центральный дисульфидный мостик, (4) антикалины, полученные из липокалинов, многообразное семейство бета-баррель-белков с восьмью нитями (приблизительно 180 остатков), которые естественным образом образуют связывающие участки для небольших лигандов по-

средством четырех структурно вариабельных петель на открытом конце, которые в достаточной степени присутствуют у людей, насекомых и во многих других организмах, (5) дарпины, синтезированные домены с анкириновыми повторами (166 остатков), которые обеспечивают жесткую границу раздела вследствие обычно трех повторяющихся бета-витков и, наконец, несколько других связывающих белков на основе более специфических структур, такие как мультимеризованный LDLR-A модуль (авимеры или держащие цистеин ноттин-пептиды).

Наряду со многими привлекательными свойствами сконструированных каркасов, они ограничиваются своей низкой молекулярной массой, что приводит к быстрому удалению после внутривенной инъекции. Дополнительным объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримеров и сконструированных полипептидов для внутриклеточной доставки сконструированных полипептидов для нарушения механизмов роста опухоли. В предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты сульфатированных дендримеров и сконструированных полипептидов, где полипептидами являются конъюгаты дендримера с аффителом, конъюгаты дендримера с доменом Кунитца, конъюгаты дендримера с антикалином, конъюгаты дендримера с аффилином, конъюгаты дендримера с моноптелом (аднектин), конъюгаты дендримера с дарпином и конъюгаты дендримера с пептидом. В особенно предпочтительном варианте осуществления объектом настоящего изобретения являются конъюгаты дендримера с сконструированными белками, которые обнаруживают высокую аффинность связывания с терапевтической мишенью в пикомолярном диапазоне и высокую стабильность, такими как дарпины.

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

Определения.

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

Термин "дендример" D, используемый в настоящем документе, в большинстве случаев обозначает разветвленные молекулы, где дендример обычно имеет симметричную структуру, окружающую ядро, и часто принимает сферическую трехмерную форму. Дендритные молекулы характеризуются структурным совершенством. Дендримеры являются монодисперсными и обычно высокосимметричными сферическими соединениями. Дендритные молекулы можно условно разделить на низкомолекулярные и высокомолекулярные виды. Первый вид соединений включает дендримеры и дендроны, а последний включает дендронизированные полимеры, гиперразветвленные полимеры и полимерную щетку.

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

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

$D(OSO_3^-M^+)_n$ означает, что дендример D является высокосульфатированным, имея количество n сульфатных групп $(OSO_3^-M^+)$. Сульфатные группы предпочтительно получают из гидроксильных групп, которые преобразуют в сульфатные группы (моноэфирные сульфоновой кислоты) посредством процесса

сульфатирования (смотри также примеры). Соответственно дендримеры содержат определенное количество сульфатных групп, полученных из групп ОН. Эти группы ОН предпочтительно расположены на поверхности или внешней оболочке дендримера и являются частью структурных элементов, используемых для образования структуры дендритных полиолов.

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

Синтез дендримеров известен специалистам в данной области техники. Общая структура дендримера может быть построена посредством конвергентного синтеза или дивергентного синтеза (Tomalia, WO 2006/115547; Medina et al., Chem. Rev. 2009, 109, 3141; Crespo et al., Chem. Rev. 2005, 105, 1663). Предпочтительный вариант осуществления синтеза представляет собой способ синтеза, где звено ядра (как описано выше) модифицируется таким образом, чтобы линкерное звено или функциональная группа зафиксировалась для дополнительного расширения посредством дополнительного линкерного звена. Затем дендример конструируется путем дивергентного добавления дополнительных оболочек, начиная со звена ядра. Таким образом, линкер, присоединенный к звену ядра, находится в центральном положении в качестве сердцевин. Сочетание посредством конвергентного синтеза может осуществляться с последующим добавлением дополнительного дендримерного звена, которое предварительно было построено либо дивергентным, либо конвергентным способом, к звену ядра или оболочкам, создавая, таким образом, дополнительную оболочку. Кроме того, конвергентно синтезированный дендример с фокальным присоединением линкера может затем быть дополнительно модифицирован путем дивергентного добавления дополнительных оболочек. Вариант осуществления дополняется примерами синтеза (1-11).

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

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

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

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

В соответствии с настоящим изобретением "конъюгат" представляет собой молекулу, которая со-

стоит двух или более различных типов молекул, которые ковалентно связаны друг с другом с помощью линкера или спейсера, образуя, таким образом, конъюгат.

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

Противоион M^+ представляет собой ион щелочного металла. Предпочтительным является натрий, дающий группы $-SO_3^-Na^+$.

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

Используемый в настоящем описании термин "миметики антител" представляют собой органические соединения, которые, подобно антителам, могут специфически связывать антигены, но которые структурно не связаны с антителами. Они представляют собой обычно искусственные пептиды или белки с молекулярной массой приблизительно от 3 до 20 кДа. Нуклеиновые кислоты и малые молекулы иногда считаются миметиками антител, а также, но не искусственные антитела, фрагменты антител и рекомбинантный белок, состоящие из них. Некоторые типы имеют подобную антителу бета-складчатую структуру. Общими преимуществами, по сравнению с антителами, являются лучшая растворимость, проникновение в ткани, устойчивость по отношению к нагреву и ферментам, а также сравнительно низкие производственные затраты. Миметики антител разрабатываются в качестве терапевтических и диагностических средств. Термин "каркасы", используемый выше, охватывается термином "миметики антител". Используемый в настоящем описании термин "эффектор" относится к эффекторной молекуле, которая может выступать в качестве терапевтической или диагностической эффекторной молекулы. Терапевтическая эффекторная молекула обычно представляет собой молекулу, которая селективно связывается с белком и регулирует его биологическую активность. Таким образом, терапевтические эффекторные молекулы действуют в качестве лигандов, которые могут повышать или понижать активность ферментов, экспрессию генов или клеточную сигнализацию. Эффекторные молекулы также могут непосредственно регулировать активность некоторых молекул мРНК (рибопереключател). В контексте настоящего изобретения полипептиды, включая белки и антитела, описанные выше, рассматриваются как функционирующие в качестве терапевтических эффекторных молекул, в частности в клеточных каскадах сигнальной трансдукции.

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

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

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

Описание фигур

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

На фиг. 1А - ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-О-), 24 сульфатные группы,

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

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

На фиг. 2А - ядро на основе, например, пентаэритритола или TRIS, дендримерные звенья: пентаэритритол и глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-О-), 36 сульфатные группы.

На фиг. 2В - ядро на основе 2,2-бис-(гидроксиметил)пропионовой кислоты, дендримерные звенья: 2,2-бис-(гидроксиметил)пропионовая кислота, связанная как сложный эфир, и глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-О-), 32 сульфатные группы.

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

На фиг. 3А - ядро на основе, например, аминокетил-трис(пропионовая кислота) или гидроксиметил-трис(пропионовая кислота), связанной как амид, дендримерные звенья: глицерин, 1,2-замещенный, и глицерин, 1,3-замещенный, связанный как простой эфир (-О-), 24 сульфатные группы,

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

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

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

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

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

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

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

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

На фиг. 6А - ядро на основе монофункционализованного циклодекстрина (здесь β -циклодекстрин): дендримерные звенья: глицерин, 1,2-замещенный, связанный как простой эфир (-О-), 40 сульфатных групп.

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

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

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

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

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

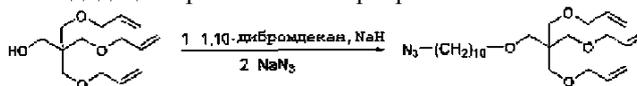
Примеры

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

изобретения.

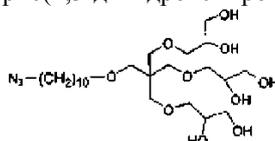
Пример 1. Синтез полиглицериновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и аминокдецильным линкером (соединение d01).

Пример 1а. Синтез 10-азидодецил-триаллилпентаэритритола



К раствору триаллилпентаэритритола (5 г, 19,5 ммоль) в 50 мл сухого ТГФ добавляли частями твердый NaH (3,9 г, 98 ммоль, 60% дисперсия в минеральном масле). Смесь перемешивали при 40°C в течение 3 ч с последующим добавлением 0,3 г йодида калия и раствора 1,10-дибромдекана (29,3 г, 98 ммоль) в 20 мл ТГФ. Через 24 ч при нагревании с обратным холодильником смесь обрабатывали водой, упаривали досуха и остаток растворяли в смеси вода/дихлорметан. Продукт экстрагировали в дихлорметане, сушили над Na₂SO₄ и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (циклогексан/этилацетат) с выходом 8,1 г промежуточного соединения 10-бромдецил-триаллилпентаэритритола. 8 г (16,8 ммоль) промежуточного продукта растворяли в ДМФ (50 мл) и добавляли азид натрия (5,6 г, 84 ммоль). Смесь перемешивали при 80°C в течение 24 ч с последующим фильтрованием и упариванием растворителя. Хроматографическая очистка (циклогексан, затем дихлорметан:метанол 95:5-1:1) давала 4,0 г (55%) продукта в виде светло-желтого масла.

Пример 1b. Синтез 10-азидодецил-трис(2,3-дигидроксипропил)пентаэритритола



Взаимодействие осуществляли в соответствии с Zieringer et al., ChemPhysChem, 2010, 1, 2617. В 300 мл смеси трет-бутанол/вода (1:1) растворяли 10-азидодецил-триаллилпентаэритритол (4,0 г, 9,1 ммоль). К указанной смеси добавляли триметиламин-N-оксид дигидрат (9,1 г, 82,4 ммоль), лимонную кислоту (10,0 г, 47,7 ммоль) и калия осмат дигидрат (0,4 г, 1,1 ммоль) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 24 ч. Добавляли ионообменную смолу Lewatit K6267 (70 г) и смесь оставляли перемешиваться в течение еще 1 ч. После фильтрования и промывки смесью трет-бутанол/вода 1:1 раствор упаривали досуха и остаток очищали хроматографией (RP C-18 Licorger), используя смесь вода/метанол в ЖХСД системе. Выход продукта составлял 3,5 г (71%) в виде бесцветного вязкого масла.

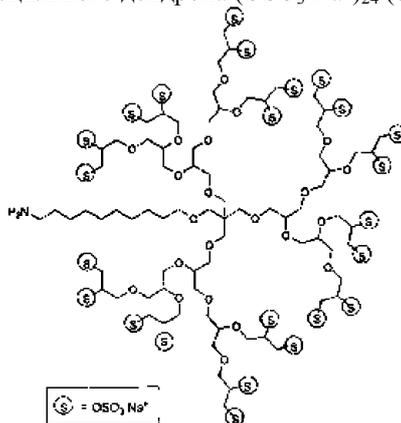
Пример 1с. Синтез дендримера из 10-азидодецил-трис(2,3-дигидроксипропил)пентаэритритола.

Дендример получали известными способами из дендрона, состоящего из глицериновых мономеров (1,2-замещенная структура), с использованием 24 гидроксигрупп (Zieringer et al., Chem. Phys. Chem. 2010, 11, 2617 и Wyszogrodzka et al., Eur. J. Org. Chem. 2008, 53) в течение 4 реакционных стадий чередующегося аллилирования со смесью NaH/аллилбромид и дигидроксилирования. Продукт представлял собой 10-азидодецил-глицерин (OH₂₄) с молекулярной массой 1873 г/моль, который сульфатировали на следующей стадии.

Пример 1d. Сульфатизация 10-азидодецильного дендрона(OH)₂₄.

100 мг (0,053 ммоль) 10-азидодецильного дендрона (OH₂₄) растворяли в 0,5 мл сухого ДМФ и нагревали до 60°C. При перемешивании добавляли SO₃-пиридиновый комплекс (245 мг, 1,54 ммоль) с последующим перемешиванием в течение 5 ч при 60°C и 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили водой, значение pH доводили до 9-10 с помощью 1 mM NaOH, фильтровали и подвергали ультрафильтрации (MWCO 1000) с водой. После лиофилизации получали продукт 10-азидодецильный дендрон (OSO₃⁻Na⁺)₂₄ (150 мг, 65%). Элементарный анализ показал полную сульфатизацию. N 0,863, C 21,70, S 17,83, H 3,042, молекулярная масса 4322 г/моль.

Пример 1е. Синтез 10-аминодецильного дендрона (OSO₃⁻Na⁺)₂₄ (соединение d01)

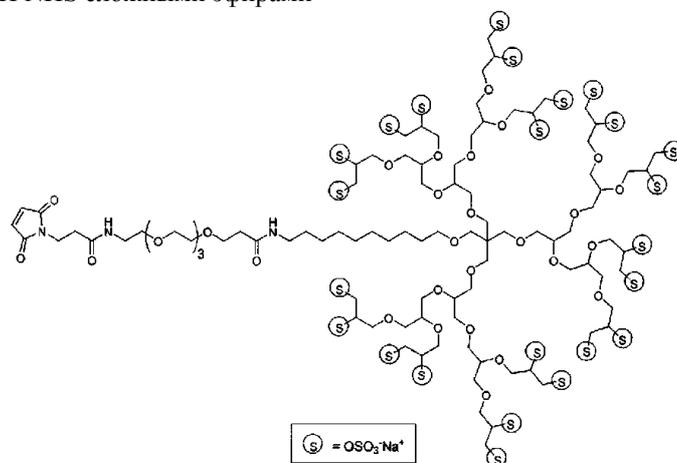


К раствору 10-азидодецилдендрона $(OSO_3^-Na^+)_{24}$ (150 мг, 0,035 ммоль) в смеси вода/метанол 1:1 (2 мл) добавляли ТСЕР (60 мг, 0,2 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. После упаривания остаток подвергали диализу против 20% NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1000) с выходом 107 мг (72%) соединения d01 после лиофилизации (молекулярная масса 4296 г/моль).

Пример, помимо декана, также может охватывать алкановые заместители, включая, например, использование 1,6-дибромгексана, 1,8-дибромоктана, 1,11-дибромундекана или других дибромалканов с использованием ненасыщенных, циклических или замещенных фрагментов в соответствии с описанием линкера L в общей формуле E-[G-L-D($OSO_3^-M^+$) $_n$] $_m$. Кроме того, линкер может быть введен с помощью фрагмента ПЭГ-алкан, например, азидо-ПЭГ-алкилбромид/иодид (или мезилат, тозилат), такого как азидо-ПЭГ $_{3-10}$ -(CH $_2$) $_{2-18}$ -Br.

Пример 2. Синтез полиглицериновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и реакционноспособными группами для биоконъюгации из соединения d01 путем взаимодействия с бифункциональными ПЭГ-COОН NHS сложными эфирами.

Пример 2а. Синтез полиглицериновой дендримерной системы с 24 сульфатными группами и реакционноспособной группой малеимида (соединение d02) из соединения d01 путем взаимодействия с малеимида-ПЭГ(4)-COОН NHS сложными эфирами



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

Примеры 2b-h.

Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и дополнительными реакционноспособными линкерами осуществляется с использованием различных бифункциональных ПЭГ-COОН NHS сложных эфиров, содержащих азидо, пропаргил, циклооктинил, пиридинилдисульфид, тиацетил или малеимидогруппу. Взаимодействие с соединением d01 осуществляли в соответствии с примером 2а (выход 70-85%). В табл. 1 приведены продукты d03-d09.

Пример 2i. Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и изотиоцианатной группой для биоконъюгации (соединение d10).

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

Таблица 1
Химически активные линкеры или группы, связанные с d01, и характеристика полученного продукта (пунктирная линия обозначает связь с аминогруппой в d01 с образованием амида)

Соединение	Линкерная структура	Молекулярная масса продукта (г/моль)	Отношение линкер : дендример
d03		4870	78
d04		4741	89
d05		4917	68
d06		4657	95
d07		4670	95
d08		4719	90
d09		4673	87

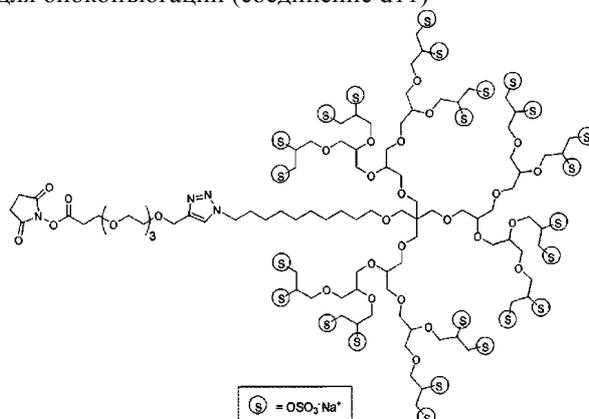
Вышеуказанные дендримерные системы типа d01 следует рассматривать как иллюстративные, и они охватывают применение других количеств n, как и некоторые указанные здесь, например, путем удвоения гидроксильных групп аллилированием/дигидроксилированием с получением 48 сульфатных групп после сульфатизации,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

Пример 3. Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и сложными эфирными группами NHS для биоконъюгации из примера 1d (азидолинкер) путем взаимодействия с бифункциональными пропаргил-ПЭГ-COOK линкерами.

Пример 3а. Клик-связывание азидодендримера (пример 1d) с пропаргил-PEG(4)-карбоновая кислота-трет-бутиловым сложным эфиром.

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

Пример 3б. Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и группой NHS сложного эфира для биоконъюгации (соединение d11)



К раствору 80 мг (17,5 мкмоль) карбоксидендримера (пример 3а) в 2 мл ДМФ добавляли 6 мкл (35 мкмоль) DIPEA с последующим добавлением 13 мг O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилуран гексафторфосфата (HSTU; 35 мкмоль). Через 18 ч перемешивания при комнатной температуре продукт выделяли путем осаждения с помощью дихлорметана (повторные циклы ДМФ/ CH_2Cl_2) и сушки в вакууме с выходом 82 мг NHS сложного эфира (соединение d11; MW 4679 г/моль) в виде аморфного твердого вещества, используемого без дополнительной очистки.

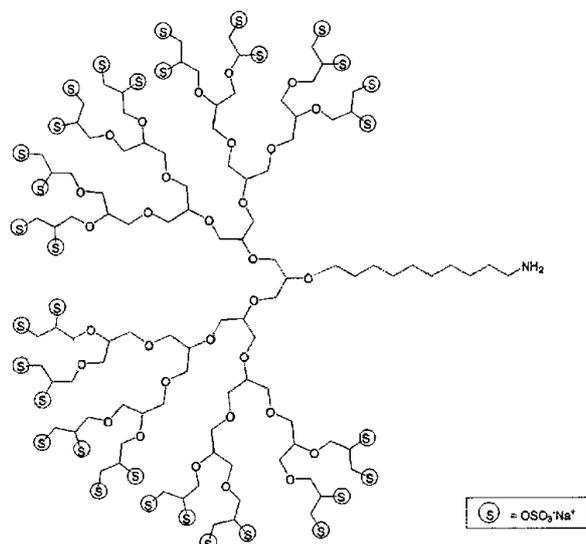
Объем изобретения в отношении полиглицериновых дендримерных систем типа d11 показывает, что функциональная группа NHS сложного эфира может быть синтезирована на полисульфатированных дендримерах и не ограничивается примером и может включать другие количества n сульфатных групп, например, путем удвоения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

Пример 4. Синтез полиглицериновых дендримерных систем, содержащих 32 сульфатные группы и реакционноспособные группы для биоконъюгации (соединение d12-d17).

Пример 4а. Модификация полиглицеринового дендримера на основе полиглицеринового дендрона [G3.0]-ОН (Wyszogrodzka M. et al., Chemistry 2008, 14, 9202) с азидоундецильным линкером.

Раствор 0,3 г (0,21 ммоль) [G3.0]-ОН (16 групп ОН, защищенный ацеталь) в 2 мл сухого ТГФ подвергали взаимодействию с 1,10-дибромдеканом, а затем с NaN_3 , как это описано в примере 1, с последующим отщеплением ацетальных групп в MeOH/HCl и очистки с помощью RP C-18 хроматографии (Liscorger), используя смесь вода/метанол с получением 0,15 г (52%) [G3.0]-O-(CH_2)₁₁-N₃ (MW 1355 г/моль).

Пример 4b. Синтез полиглицеринового дендримера с азидодецильным линкером (пример 4а) путем аллилирования/дигидроксилирования, сульфатизации и восстановления с получением аминоундецилдендримерной системы с 32 сульфатными группами (соединение d12)



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

Пример 4с-h.

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

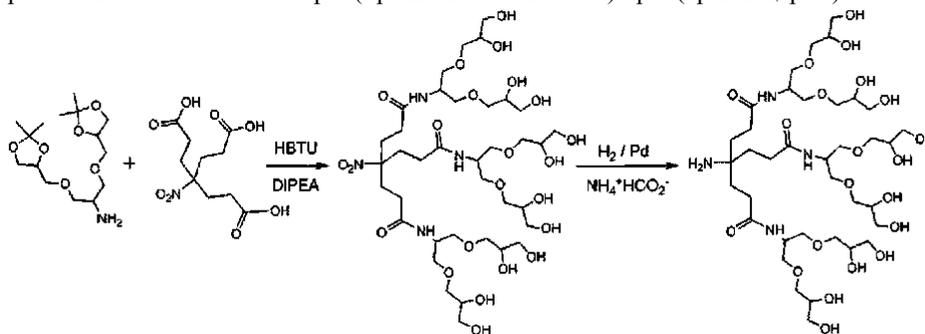
Таблица 2
 Реакционноспособные линкеры, связанные с d12, и характеристика полученного продукта (пунктирная линия указывает на связь с аминогруппой в d12 с образованием амида)

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

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

Пример 5. Синтез полиглицерин/амидодендримерных систем с 24 сульфатными группами и реакционноспособными группами для биоконъюгации на основе аминотетра-трис(пропионовая кислота) и триглицерина (соединения d18-d22).

Пример 5а. Синтез аминотетра-трис(пропионовая кислота)-трис(триглицерин)



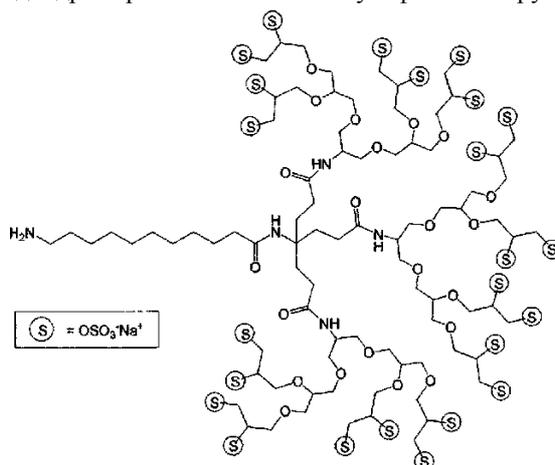
К раствору нитрометана-триспропионовая кислота (1,5 г, 5,4 ммоль) и DIPEA (3,9 г, 30 ммоль) в 15 мл ДМФ добавляли раствор HBTU (9,3 г, 24 ммоль) в 2 мл ДМФ. Через 30 мин перемешивания при комнатной температуре к раствору (7,3 г, 23 ммоль) триглицеринамина добавляли ацеталь-защищенный (1,3-бис-[2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]-2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

Пример 5b. Модификация линкера посредством 11-азидоундекан карбоновой кислоты.

К раствору 11-азидоундекан карбоновой кислоты (0,11 г, 0,5 ммоль) и DIPEA (0,16 г, 1,2 ммоль) в 2 мл ДМФ добавляли HBTU (0,2 г, 0,56 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1 ч с последующим добавлением аминотетра-трис(пропионовая кислота)-трис(триглицеринамид) (0,3 г, 0,33 ммоль: пример 5а). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч, упаривали досуха и очищали RP C-18 хроматографией (Liscorger), используя смесь вода/метанол; выход 0,26 г (71%) в виде вязкого масла.

Пример 5с. Синтез полиглицерин/амидодендримера с азидодецилкарбонильным линкером (пример 5b) путем аллилирования/дигидроксилирования, сульфатизации и азидного восстановления с получением

ем аминокетилкарбонильной дендримерной системы с 24 сульфатными группами (соединение d18).



Синтез осуществляли способом, описанным в примере 1d-e, с получением 120 мг продукта d18 в виде бесцветного аморфного твердого вещества (MW 4432 г/моль).

Пример 5c-h.

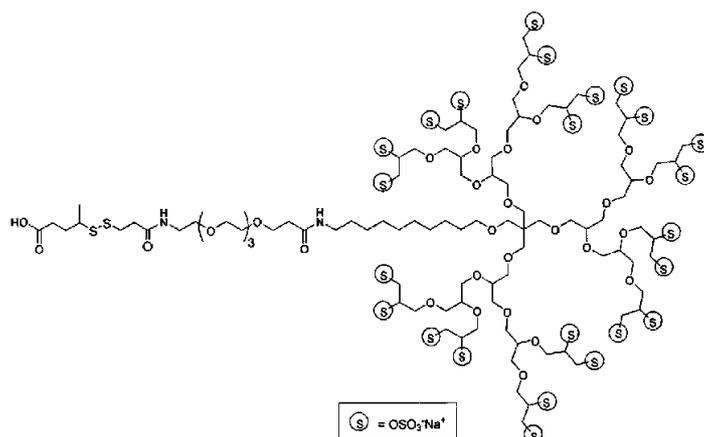
Синтез полиглицерин/амидодендримерных систем с 24 сульфатными группами и дополнительными реакционноспособными линкерами осуществляли путем использования различных бифункциональных ПЭГ-COОН NHS сложных эфиров, содержащих азидо, пропаргил, циклооктинил, пиридинилдисульфид, тиаоацетил или малеимидогруппу. Взаимодействие с соединением d01 проводили в соответствии с примером 2a/4c (выход 65-86%). В табл. 3 приведены получаемые продукты d19-d22. Другим вариантом является дериватизация аминогруппы с ангидридами, такими как ангидрид дигликолевой кислоты, известными способами для введения свободной карбоновой кислоты (продукт d22) или преобразования аминогруппы в изотиоцианатную группу (продукт d23; см. также пример 2i).

Таблица 3
Реакционноспособные линкеры, связанные с d18, и характеристика полученного продукта (пунктирная линия указывает на связь с аминогруппой в d18 с образованием амида)

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

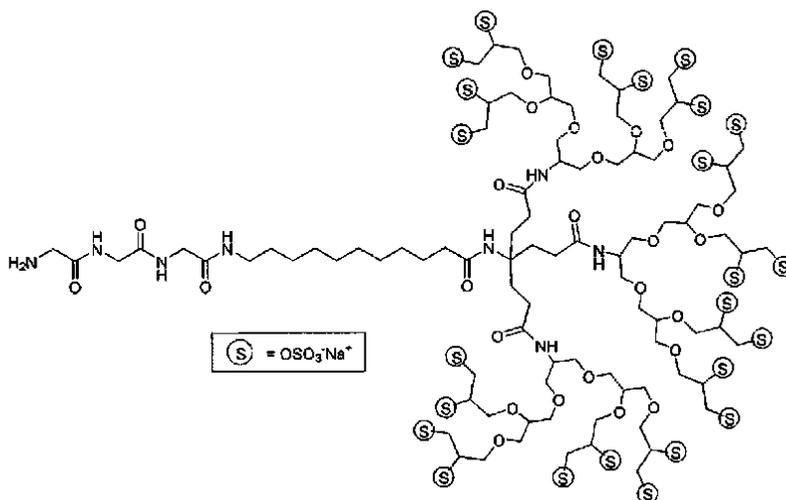
Объем изобретения в отношении полиглицериновых дендримерных систем типа d18 не ограничивается этими примерами и может включать другие количества n сульфатных групп, например, путем удвоения гидроксильных групп с помощью аллилирования/дигидроксирования с получением 48 сульфатных групп после сульфатизации, что дает соединения по аналогии с d19-d22.

Пример 6. Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами, реакционноспособной группой NHS сложного эфира и восстановительно расщепляемым дисульфидным звеном в линкере (соединение d24)



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

Пример 7. Синтез полиглицериновой/амидодендримерной системы с 24 сульфатными группами и триглицериновым мотивом для сортазаопосредованного ферментативного сшивания (d25)

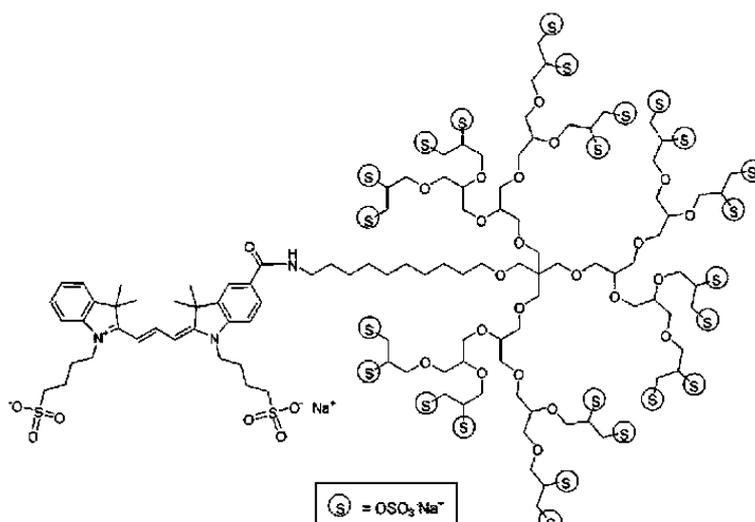


Woc-GiyGlyGly-OH (Bachem; 25 мг, 0,085 ммоль) и DIPEA (11 мг, 0,17 ммоль) растворяли в 3 мл ДМФ и добавляли NATU (38 мг, 0,1 ммоль). Через 1 ч добавляли соединение d18 (95 мг, 0,021 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 48 ч. Продукт осаждали добавлением диэтилового эфира и собирали фильтрованием. Остаток повторно промывали дихлорметаном и затем суспендировали в 5 мл смеси дихлорметан/трифторуксусная кислота 1:1 с последующим перемешиванием в течение 5 ч при комнатной температуре.

Пример 8. Синтез конъюгатов дендримерных систем с флуоресцентным красителем ICC.

Пример 8а-с. Конъюгация аминокдендримерных соединений d01, d12 и d18 с цианиновым красителем.

Цианиновые красители для мечения, такие как Cy3 или ICC, с использованием различных функциональных групп и схем замещения можно синтезировать в соответствии с известной литературой. Краситель ICC (NHS сложный эфир) представляет собой известный краситель видимого диапазона длин волн (диапазон флуоресценции 550/575 нм) (Groger et al., Bioconjugate Chem 2013, 24, 1507).

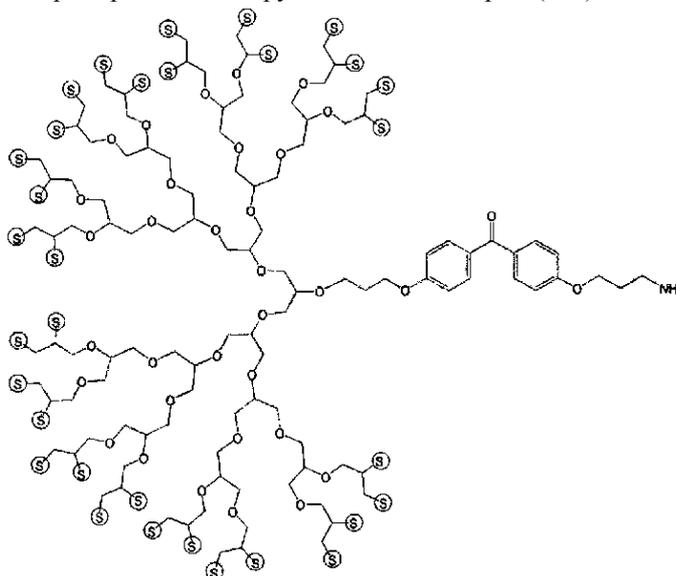


10 мг (2,33 мкмоль) соединения d01 растворяли в 1 мл смеси ДМФ/вода (9:1) и добавляли NHS сложный эфир ICC (NHS сложный эфир MiDye550, Iris Biotech., Germany) (8,9 мг, 12 мкмоль) с последующим встряхиванием при 40°C в течение 72 ч. Продукт (ICC-d01) осаждали добавлением дихлорметана и очищали RP C-18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

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

Другой способ конъюгации красителя заключается в использовании аминокдендримеров (например, d01, d12, d18) в сочетании с красителями 2-иминотиолоном и малеимидом (например, ICC малеимид) с получением, например, ICC-IT-d01 или ICC-H-d18.

Пример 9. Синтез дендримера с УФ-обнаруживаемым линкером (d26)



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

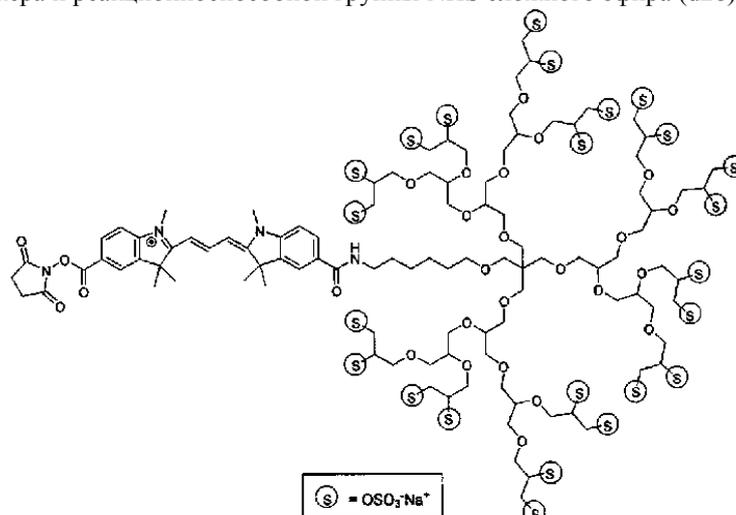
Пример 10. Синтез дендримера с линкером на основе обнаруживаемого в видимой области спектра цианинового красителя (d28).

Пример 10а. Синтез полиглицериновых дендримерных систем с 24 сульфатными группами и аминоксильным линкером (соединение d27).

Соединение d27 является аналогом d01 с аминоксильной группой и синтезируется в соответствии

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

Пример 10b. Конъюгация с индоцианиновым фрагментом в качестве обнаруживаемого в видимой области спектра линкера и реакционноспособной группы NHS сложного эфира (d28)



5,5'-Дикарбокси-1,1'-диметилиндокарбацианин моноацетат синтезировали в соответствии с известными процедурами. К раствору 0,1 г (0,2 ммоль) указанного красителя и DIPEA (0,11 г, 0,8 ммоль) в 3 мл ДМФ добавляли раствор НВТУ (0,31 г, 0,8 ммоль) в 0,5 мл ДМФ. Через 90 мин перемешивания при комнатной температуре добавляли частями в виде твердого вещества d027 (0,17 г, 0,04 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 60°C в течение 72 ч. Продукт осаждали добавлением 3 мл диэтилового эфира и собирали центрифугированием. Очистка с помощью RP C-18-хроматографии (Licorger) с использованием смеси вода/метанол давала 0,12 г промежуточного соединения после лиофилизации. Превращение в NHS сложный эфир осуществляли путем добавления к раствору промежуточного соединения НСТУ (75 мг, 0,2 ммоль) и 35 мкл DIPEA в 1 мл ДМФ и перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим осаждением в диэтиловом эфире (повторные циклы смеси ДМФ/диэтиловый эфир) с получением 0,10 г продукта d28 (молекулярная масса 4743 г/моль).

Пример 11. Синтез конъюгатов дендримерных систем с белками и антителами.

Пример 11a. Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с малеимидогруппами (d02, d03, d13, d14, d19, d20).

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

Пример 11b. Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с пиридилдисульфидной группой (d04, d05, d15, d21).

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

Пример 11c. Общий способ конъюгации с использованием дендримерных систем с изотиоцианатом или группой NHS сложного эфира (d10, d11, d23).

Раствор 2 мг белка в 1 мл PBS с pH 7,4 подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. дендримера на основе изотиоцианата или NHS сложного эфира (например, d10, d11, d23) в течение 24 ч. Смесь подвергали очистке в трис-буферизированный физраствор (TBS; pH 7,4) с использованием колонки NAP 10 или кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа).

Пример 12. Синтез конъюгатов дендримерных систем с ферментами.

Пример 12a. Конъюгация дендримерных систем с малеимидогруппами (d02, d13, d19) с ферментом L-аспарагиназы.

L-аспарагиназа представляет собой гомотетрамер, состоящий из 4-х звеньев с молекулярной массой 34 кДа, который может быть модифицирован на дисульфидном мостике в каждом из мономерных звеньев (Balan et al., Bioconjugate Chem 2007, 18, 61). L-аспарагиназу (10 мг, 0,29 мкмоль мономер: L-

аспарагиназа 5000Е, Medac Germany) растворяли в 2 мл 50 мМ фосфатного буфера с рН 8/10 мМ ЭДТК. Добавляли дитиотреитол (ДТТ; 80 мг) и раствор встряхивали в течение 1 ч. Избыточное количество дитиотреитола (ДТТ) удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (Sephadex G50; фосфатный буфер с рН 8/10 мМ ЭДТК). К полученному раствору (приблизительно 8 мг в 4 мл, что измерено с помощью УФ) добавляли раствор 2,3 мкмоль (8 моль-экв.) малеимиодендримера (например, d02, d13, d19) в приблизительно 0,2 мл воды с последующей инкубацией в течение 24 ч при осторожном встряхивании. Очистку выполняли с помощью ультрафильтрации (centriprep flasks, регенерированная целлюлоза, MWCO 20000).

Пример 12b. Конъюгация дендримерных систем с малеимидогруппой (d02) с ферментом ДНКазы.

Синтез осуществляли способом, описанным в примере 11a, с получением ДНКазы-d02 в виде раствора в TBS с рН 7,4.

Пример 12c. Конъюгация дендримерных систем с изотиоцианатной группой (d10) с ферментом ДНКазы.

К раствору 2 мг (65 нмоль) ДНКазы (деоксирибонуклеаза I из бычьей поджелудочной железы, 31 Да) в 1 мл PBS, рН 7,4 добавляли 5 моль-экв. изотиоцианатного дендримера d10 (1,4 мг) в 0,2 л PBS с последующим взаимодействием при комнатной температуре в течение 18 ч. Очистку осуществляли с помощью кассет для диализа Slide-A-Lyzer (сложный эфир целлюлозы, MWCO 10 кДа) в TBS с рН 7,4.

Таблица 4

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

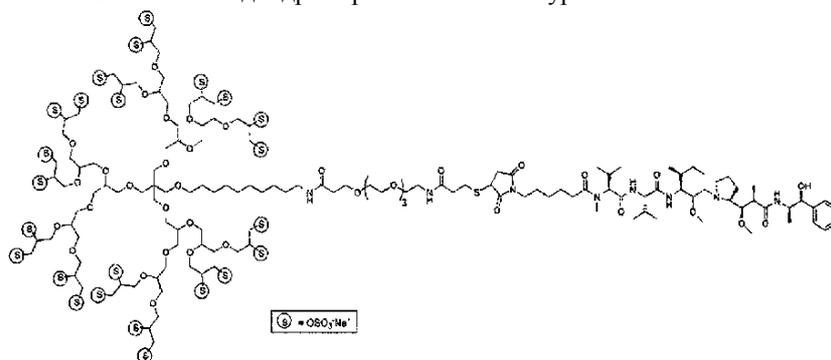
белок	дендример	конъюгированный продукт в соответствии с общей формулой I
сапорин	d02, d13, d19	сапорин-d02 сапорин-d13 сапорин-d19
овальбумин	d02, d03, d20, d28	ova-d02 ova-d03 ova-d20
белок	дендример	продукт конъюгации в соответствии с общей формулой I
сапорин	d02, d13, d19	сапорин-d02 сапорин-d13 сапорин-d19
овальбумин	d02, d03, d20, d28	ova-d02 ova-d03 ova-d20 ova-d28
апоптин	d02, d13	apo-d02 apo-d13
дифтерийный токсин	d02, d13	dph-d02 dph-d13
человеческий сывороточный альбумин (HSA)	d21	HSA-d21
рекомбинантный цистеиновый белок G	d02, d13, d19	ProtG-d02 ProtG-d13 ProtG-d19
бевацизумаб	d10, d11, d13	bev-d11
		bev-d23
IgG	d22 d28	IgG-d22 IgG-d28
L-аспарагиназа	d02, d13, d19	asp-d02 asp-d13 asp-d19
ДНКазы	d02, d10	ДНКазы-d02 ДНКазы-d10

Протеиновые конъюгаты с дендримерными системами в соответствии с табл. 4 могут быть дополнительно конъюгированы с флуоресцентными красителями для обнаружения конъюгатов в биологических системах. Флуоресцентное мечение представляет собой известную процедуру и может быть выполнено с различными реакционноспособными флуорофорами. При этом NHS сложный эфир красителя ICC

(Groger et al., *Bioconjugate Chem* 2013, 24, 1507) используют в примерах, демонстрирующих результаты клеточного захвата с помощью FACS и микроскопии.

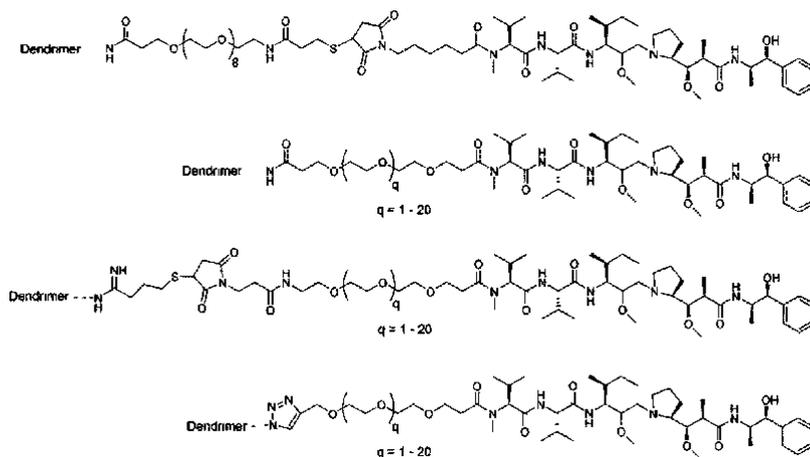
Пример 13. Синтез конъюгатов дендримерных систем с низкомолекулярными пептидами и пептидомиметиками.

Пример 13а. Синтез конъюгата дендримера с монометил ауристатином Е

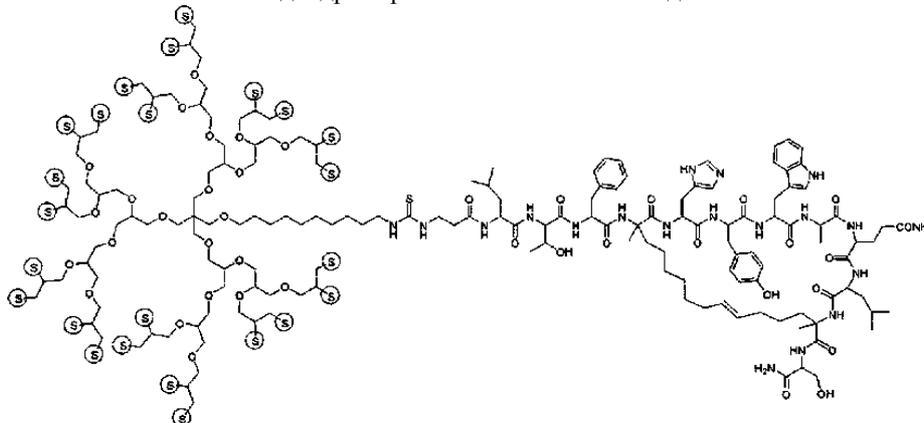


Малеимидакапроил-монометил ауристатин Е (mC-MMAE) может быть синтезирован в соответствии с литературой (Doronina et al., 2006, 17, 114). Конъюгация достигалась путем растворения дендримера d09 (2 мг, 0,43 мкмоль) в 0,5 мл водного раствора гидроксилamina с концентрацией 50 мМ с последующим добавлением maleимидакапроил-монометил ауристатина Е (0,37 мг в 0,5 мл ДМФ/PBS 1:1). После инкубирования в течение 18 ч при 25°C продукт осаждали с помощью дихлорметана с последующей 11 ПТХ очисткой (вода/метанол) с получением MMAE-d09 (1,1 мг).

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



Пример 13б. Синтез конъюгата дендримера с волокнистым пептидом



Волокнистый пептид для активации пути p53 (ATSP-3900 с N-терминальным В-аланином) может быть синтезирован в соответствии с литературой (Chang et al., *PNAS* 2013 110, E3445). Конъюгация достигается путем растворения дендримера d10 (2 мг, 0,46 мкмоль) в 50 мл 0,5 мМ фосфатного буфера с pH 8. К указанному раствору добавляли раствор В-аланил-ATSP-3900 (0,65 мг, 0,40 мкмоль) в 0,2 мл ДМФ с последующим взаимодействием при 40°C в течение 2 4 ч. Очистку осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (вода/метанол) с получением конъюгата ATSP3900-d10 (0,8 мг).

Пример 13с. Синтез дендримерных конъюгатов с пептидами, имеющими альфа-спиральные структуры, полученными из природных связывающих мотивов.

Пептидные последовательности P1-P7 (в качестве С-терминальных амидов) синтезировали посредством общего твердофазного пептидного синтеза. Эти пептиды несут N-концевой цистеин для конъюгации малеимидодендримеров с тиольной группой. Осуществляли конъюгацию с дендримерами d02, d03, d13, d14, d19. В качестве примера описана процедура применения дендримера d02: 1 мг пептида растворяли в 200 мкл ДМФ и дополнительно растворяли 50 мМ фосфатным буфером (до 500 мкл). К этому раствору добавляли 5 моль-экв. ТСЕР (исходный раствор в воде), затем 0,9 моль-экв. дендримера, растворенного в 200-300 мкл воды. Смесь осторожно встряхивали при 25°C в течение 18 ч. Очистку осуществляли посредством ВЭЖХ (вода/ацетонитрил), или эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, вода/ДМФ), или сочетания обоих этих методов с получением конъюгатов, перечисленных в табл. 5.

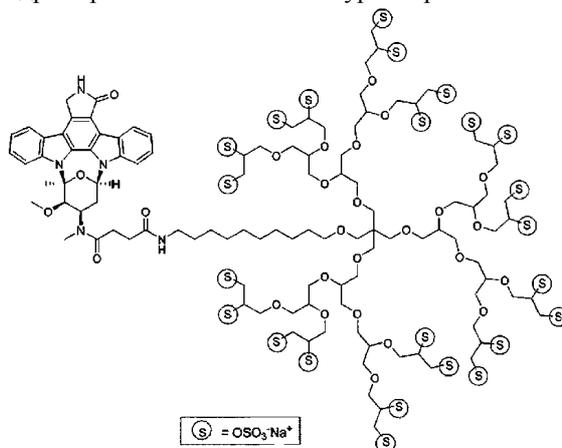
Таблица 5

Пептидные конъюгаты с дендримерами
в соответствии с примером 13с

#	Исходный белок	Последовательность	
		синтезированного пептида для конъюгации	конъюгаты
P1	BIM	CGMRPEIWIQAQLRRIGDEFNA	d02-P1
P2	BIM	CGDMRPEIYI (Aib) QELRRIGD (Aib) Y	d02-P2
P3	Bc19	CGLSQEQLEHRERSLQTLRDIQRMLF	d02-P3, d03-P3
P4	Bc19/2	CGLSKEQLEHRERSLQTLRDIERLL	d02-P4, d03-P4
P5	PUMA	CGEEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	d02-P5
P6	BID	CGEDIIRNIARHAAQVGASADRSI	d02-P6
P7	c-мус	CPKVVILKKATAYILSVQAEEQKL	d02-P7

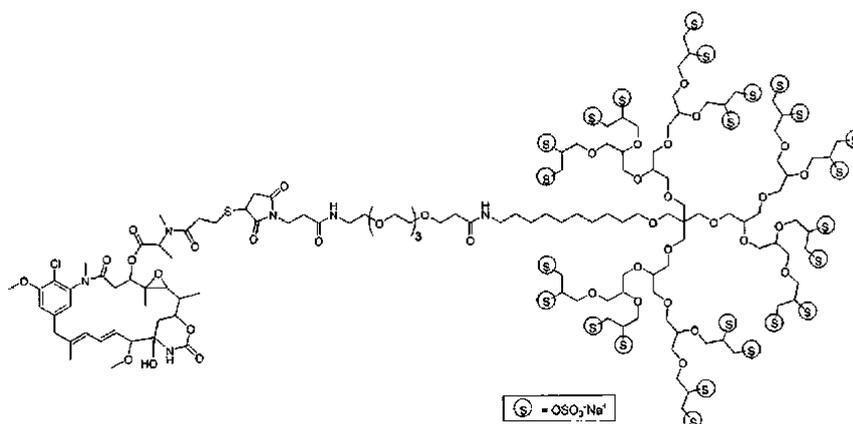
Пример 14. Синтез конъюгатов дендримерных систем с низкомолекулярными ингибиторами.

Пример 14а. Синтез дендримерного конъюгата с стауроспорином



Стауроспорин представляет собой ингибитор киназ, который может быть конъюгирован с молекулами-носителями с сохранением своей ингибирующей активности. Сукциноилстауроспорин синтезировали описанным способом (Caravatti et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 399) и конъюгировали с d01 в ДМФ с использованием условий НАТУ/DIPEA связывания.

Пример 14b. Синтез дендримерного конъюгата с производным мaitансина



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

Пример 15. Клеточный захват конъюгатов дендример-ИСС краситель (пример 8) и конъюгатов дендример-белок (пример 11).

Линии клеток злокачественной опухоли человека A2780 и QGP-1 культивировали в среде RPM1 с добавлением 10% телячьей эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2% глутамина и пенициллина/стрептомицина. Все клетки высевали в культуральную среду при концентрации 1×10^5 клеток/мл, культивировали при 37°C с 5% CO_2 и разделяли 1:5 два раза в неделю. Линии эпителиальных клеток злокачественной опухоли человека A549, MCF7, HaCaT и HspG2 выращивали в среде DMEM (PAN Biotech) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FCS, 2% глутамина и пенициллина/стрептомицина. Клетки высевали в среду при концентрации 1×10^5 клеток/мл (37°C с 5% CO_2 , разделяли 1:5 два раза в неделю). Клетки HT29 культивировали в среде Маккоя (PAN Biotech) с добавлением 10% FCS, 2% глутамина и пенициллин/стрептомицин. Клетки высевали в среде с концентрацией 1×10^5 клеток/мл (37°C с 5% CO_2 , разделяли 1:10 два раза в неделю). Для клеточной микроскопии клетки высевали при концентрации 2×10^5 клеток/мл в 24-луночный культуральный планшет с покровным стеклом (Sigma), культивировали в течение 24 ч при температуре 37°C, а затем культивировали в среде, содержащей 10^{-6} М ИСС-d01, ИСС-d12, ИСС-d18 или соответствующие производные с 48 сульфатными группами или конъюгаты дендримера с белками (примеры 12 и 13) или 10^{-6} М глицерин-ИСС (контроль), в течение до 24 ч при температуре 37°C. Затем клетки фиксировали охлажденным ацетоном, промывали и окрашивали 4,6-диамидино-2-фенил индолом (DAPI, Abeam) для контрастного окрашивания ядер. Получение изображений осуществляли с помощью микроскопа Leica DMRB (Leica). Изображения получали с помощью цифровой камеры (Spot 32, Diagnostic Instruments) с одним и тем же временем экспозиции для всех изображений. На фиг. 8А показан пример внутриклеточного распределения в цитозольных областях (ИСС-d01, пример 8).

Для количественного определения клеточного захвата, опосредованного сульфатированными дендримерами, ИСС-d01 (пример 8) используется для инкубирования 10^7 опухолевых клеток SKBr3 с 10^{-6} М ИСС-d01 в течение 24 ч. Это количество и время является достаточным для измерения супернатанта посредством объединения и лизиса клеток с DMSO. На фиг. 8 В показан результирующий спектр поглощения (ИСС коэффициент экстинкции (559 нм) $150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), дающий 10^{-17} моль на клетку, что соответствует приблизительно 5 био-молекулам на клетку.

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

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

Таблица 5

Значения захвата, измеренного методом FACS, относительно ICC-d01 (диапазон различных клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780) после инкубации в течение 24 ч. Все конъюгаты дополнительно конъюгировали с NHS сложным эфиром ICC и значения корректировали флуоресценцией в зависимости от отличающегося отношения красителя к белку или содержания дендримера

Соединение	% захвата
ICC-d01 (только дендримерный краситель)	100
ICC-IT-d01 (только дендримерный краситель)	85-100
ICC-d18 (только дендримерный краситель)	110-125
ICC-IT-d18 (только дендримерный краситель)	95-110
Sap (без дендримера)	5-8
Sap-d02	55-70
Дифтерийный токсин (без дендримера)	8-10
Dph-d02	45-68
L-аспарагиназа (без дендримера)	4-7
Asp-d02	85-95
ДНКаза (без дендримера)	4-12
ДНКаза-d02	50-65
IgG (без дендримера)	3-5
IgG-d02	30-45

Пример 16. Активность конъюгатов белок-дендример в опухолевых клетках.

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

Например, в табл. 6 показано, что конъюгаты токсинов, ингибирующих рибосомы, демонстрируют повышенную цитотоксичность благодаря клеточному захвату и внутриклеточной активности. Эффекты могут быть получены с использованием, например, соединений Sap-d02, Sap-d13 или Sap-d19. Подобные эффекты могут быть получены в различных линиях опухолевых клеток, таких как клетки опухоли толстой кишки HT29, клетки опухоли печени HepG2, клетки опухоли поджелудочной железы QGP-1, клетки эпидермоидной опухоли A431.

Таблица 6

Значения IC₅₀ ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780

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

Пример 17. Активность конъюгатов пептида с дендримером в опухолевых клетках.

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

Таблица 7

Значения IC₅₀ ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, A431, MCF-7, A2780

Соединение	IC ₅₀
d02-P1	0,9-2,1 мкМ
P1 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P2	0,8-1,7 мкМ
d02-P3	0,6-1,2 мкМ
P3 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P4	0,4-1,1 мкМ
P4 (пептид без дендримера)	10 мкМ
d02-P5	0,8-2,0 мкМ
P5 (пептид без дендримера)	1>0 мкМ
d02-P6	1,2-2,3
P6 (пептид без дендримера)	>10 мкМ
d02-P7	1,1-1,8 мкМ
P7 (пептид без дендримера)	>10 мкМ

Пример 18. Селективность внутриклеточного захвата дендримерных конъюгатов с белками: эффекты ингибиторов в отношении захвата конъюгата L-аспарагиназы Asp-d02 (пример 12a).

Исследования клеточного захвата, измеренного методом FACS, проводили способом, описанным в примере 13. Соединение Asp-d13 инкубировали при концентрации 10⁻⁷ М в опухолевых клетках QGP-1 в течение 3 и 6 ч. Инкубацию проводили в присутствии одного из двух следующих субстратов: (1) 0,1 мМ генистеин, ингибитор эндоцитозного захвата (Rejman et al., Mol. Ther. 2005, 12, 468-474) или (2), 50 мМ рифамицин, ингибитор захвата посредством белков-транспортёров органических анионов (OATP; Vi et al., Drug Metab Dispos. 2012. 40, 1085-92). Результаты показывают, что FACS-сигналы по отношению к Asp-d13 без ингибитора (определяется как 100%) снижаются в присутствии рифамицина до 37-40%, в то время как значительное снижение не может быть измерено в присутствии генистеина (80-85%), смотри данные в табл. 7. Для L-аспарагиназы, связанной с полиглицеринсульфатом (средняя молекулярная масса 12000 Да, используется в соответствии с WO 2011/095311), может быть идентифицирован эндоцитоз благодаря ингибированию генистеином.

Таблица 7
Относительные значения ингибирования захвата в клетки QGP-1
в присутствии рифамицина или генистеина

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

Пример 19. Активность конъюгатов белка с дендримером в опухолевых клетках по сравнению с сульфатированным полимером.

В этом примере присоединен полимер (среднее значение при 6000 г/моль, синтезированным в соответствии с Groger et al., *Bioconjugate Chem* 2013, 24, 1507). Этот полимер функционализировали с линейным малеимидо-PEG(4)-COOH-NHS сложным эфиром, описанным в примере 2а, и дополнительно очищали с помощью хроматографии на RP. Конъюгацию с сапорином осуществляли способом, описанным в примере 11. Сравнительные измерения цитотоксичности осуществляли в соответствии с примером 16 с получением значения IC_{50} из теста МТТ в 4-х различных клеточных линиях (см. табл. 8).

Таблица 8
Значения IC_{50} ингибирования пролиферации клеток, измеренной с помощью теста МТТ (изменяются в зависимости от клеточных линий: HT29, HepG2, QGP-1, MCF-7)

Соединение	IC_{50}
Sap (без дендримера)	>1 мкМ
Sap-d02	2-5 нМ
Sap-полиглицерин сульфат	38-45 нМ

Пример 20. Способы хемоселективной и сайт-специфической конъюгации дендримеров с белками с использованием N-концевого цистеина (цистеиновая метка).

Пример 20а.

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

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

Пример 20b.

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

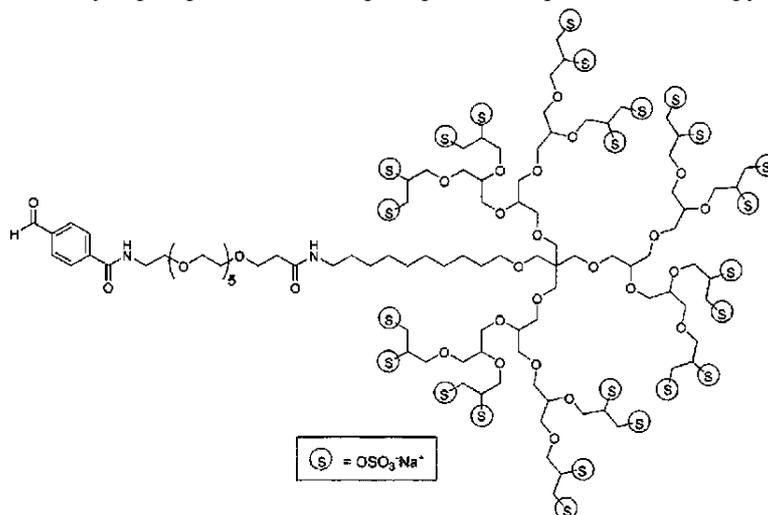
Синтез сульфатированных дендримеров с группой сложного тиоэфира: раствор сульфатированного дендримера с NHS сложным эфиром (d11, 10 мг) в ДМФ (1 мл) подвергали взаимодействию с 10 моль-экв. Метилового эфира 3-тиопропионовой кислоты (Xiao et al., *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23, 6046-6051) в течение 24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

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

тельно конъюгирован с флуоресцентным красителем (таким как ИСС малеимид).

Пример 21. Хемоселективная конъюгация путем восстановительного аминирования с использованием сульфатированного дендримера с карбальдегидной группой.

Пример 21а. Синтез сульфатированного дендримера d31 с карбальдегидной группой

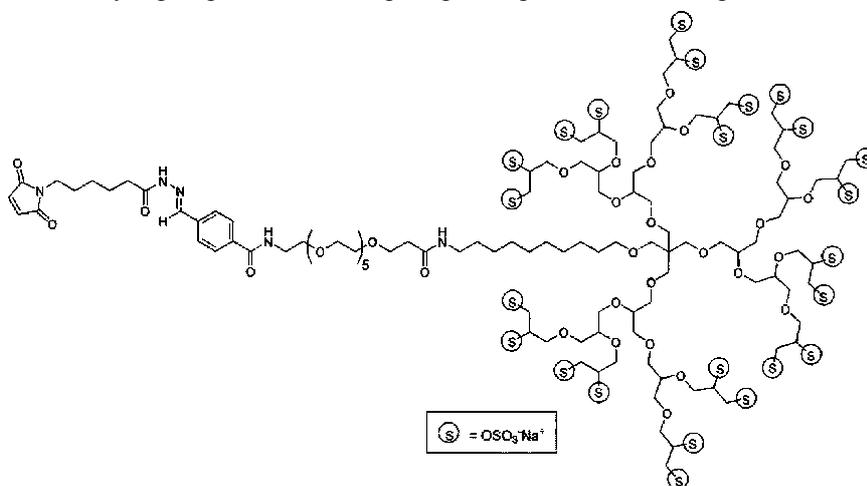


Азидогруппу в дендримере d06 (пример 2е) восстанавливали до амина с помощью ТСЕР. К раствору d06 (50 мг, 0,01 ммоль 1) в 1 мл смеси вода/метанол (1:1) добавляли ТСЕР (20 мг, 0,067 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. После упаривания остаток подвергали диализу против 20% NaCl и дистиллированной воды (регенерированная целлюлоза, MWCO 1000) с получением 4-5 мг (90%) соединения d30 после лиофилизации (молекулярная масса 4631 г/моль). Модификацию с карбальдегидом осуществляли путем взаимодействия с N-гидроксисукцинимидильным эфиром 4-формилбензойной кислоты (Hooker, J.M. и др., Nano Letters 2007. 7, 2207-2210) в смеси ДМФ/вода с выходом сульфатированного дендримера d31 в виде твердого осадка (молекулярная масса 4763 г/моль).

Пример 21b. Хемоселективная конъюгация сульфатированных дендримеров d31 с белками посредством восстановительного аминирования.

Процесс осуществляли с белковыми растворами 2,5 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7,0. Общая процедура: раствор 1 мг белка (0,4 мл) и 3-моль экв. дендримера d31 обрабатывали исходным раствором цианоборогидрида натрия (NaBH_3CN) в воде с получением конечной концентрации 1 мМ NaBH_3CN в смеси, который осторожно встряхивали в течение 48 ч при температуре 20°C. Очистку осуществляли с помощью кассет для диализа Slide-A-Lyzer (регенерированная целлюлоза, MWCO 20 кДа) в TBS с pH 7,4. Дендримерную конъюгацию определяли методом гель-электрофореза с получением конверсии 50-70% белка в конъюгаты (отношение дендримера к белку неизвестно). Используемые белки представляли собой овальбумин, сапорин, дифтерийный токсин и неспецифический IgG. Очистку осуществляли с помощью SEC ВЭЖХ. Анализ отношения дендримера к белку осуществляли с помощью гель-электрофореза.

Пример 22. Конъюгация сульфатированного дендримера с белками посредством связи, расщепляемой кислотой: Синтез сульфатированного дендримера с гидразоновым линкером и малеимидогруппой



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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат формулы



где E представляет собой терапевтическую или диагностическую эффекторную молекулу, выбранную из группы, состоящей из пептидов или пептидомиметических структур и белков, в которой D $(OSO_3^+M^+)_n$ представляет собой дендример D, несущий сульфатные группы $OSO_3^+M^+$ в количестве n,

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

где M представляет собой ион щелочного металла,

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

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

где m равно целому числу от 1 до 20,

где все дендримеры D указанного конъюгата имеют одинаковую молекулярную массу,

где количество n сульфатных групп является одинаковым для каждого дендримера D, и

где линкер L ковалентно связан с сердцевиной дендримера D в положении, из которого дендример растет с образованием своей дендритной структуры, и

где дендримеры $D(OSO_3^+M^+)_n$ обладают следующими соотношениями n и молекулярной массы

количество ионов (n)	сульфат-	Молекулярная масса $D(OSO_3^+M^+)_n$ не превышает
6		2000 Да
8		2400 Да
12		4000 Да
16		5500 Да
18		6000 Да
24		8000 Да
30		10000 Да
32		11000 Да
36		12000 Да
40		13000 Да
48		16000 Да
72		24000 Да
96		32000 Да

и подходящий фармацевтический носитель и/или вспомогательное вещество.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где M^+ представляет собой ион натрия.

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

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, где связь указанных мономеров в дендримере D основана на функциональных группах, выбранных из простого эфира, тиоэфира, эфира карбоновой кислоты, эфира сульфониловой кислоты, сульфонида, карбоксиламида, амина, карбамата, тиокарбамата, мочевины, тиомочевины, гидразона, имида, дисульфида, фосфата, фосфоната, триазола, ацетала и кетала.

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

6. Фармацевтическая композиция по п.1, где L представляет собой C_{4-100} -алкильную группу, выбранную из группы, состоящей из алифатических циклических, разветвленных или линейных звеньев, в которых одна или несколько метиленовых групп могут независимо быть заменены звеном, выбранным из группы, состоящей из O, S, NH, NH-O, C(=O)NH, OC(=O)NH, OC(=O)O, NHC(=O)NH, NHC(=S)NH, C(=NH)NH, C(=O), S(=O)₂, S(=O), S(=O)₂O, S-S, CH=N, CH=N-NH, C=N-NHC(=O), OP(=O) (O⁻M⁺)O, P(=O) (O⁻M⁺)O, арилена, этенилена или этинилена, и триазолилена, в котором любой атом водорода мо-

жет быть независимо заменен метилом, этилом или гидроксиметилом.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой терапевтическую эффекторную молекулу, содержащую вещества, которые могут нарушать внутриклеточные механизмы пролиферации, апоптоза, синтеза вещества соединительной ткани, включающего коллаген и фибронектин, иммунитета, физиологического старения или иммунной защиты.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из цитостатиков.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из пептидных или пептидомиметических структур, включая циклические или с открытой цепью пептиды с природными или неприродными структурными модификациями.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой полипептид, который связывает мишени, выбранные из группы, состоящей из p19INK4D, GSK-3, мус, INK4A, p53, KRas, NRas, Hras, p27, KIP1, GSK3 beta, HER4, Src, PTEN, Bcl-2, Bcl-xL, mcl-1, Атаксина-1, катенина, IRAK1, IRAK2, IRAK4, VEGFR1, ZAP70, Aurora A, Aurora B и Aurora C.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, где полипептид связывает мишени, выбранные из группы, состоящей из мус, Bcl-2, Bcl-xL, mcl-1, катенина и p53.

12. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой альфа-спиральный пептид на основе белков сенсibilизации апоптоза, выбранных из группы, состоящей из BIM, BID, NOXA и PUMA.

13. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из

CGMRPEIWIAQELRRIGDEFNA,
CGDMRPEIYI(Aib)QELRRIGD(Aib)Y,
CGLSQEQLEHRERSLQTLRDIQRMLF,
CGLSKEQLEHRERSLQTLRDIERLL,
CGEEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER,
CGEDIIRNIARHAAQVGASADRSI,
CPKVVLKKAATAYILSVQAEQKL.

14. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой токсический полипептид, выбранный из группы, состоящей из дифтерийного токсина, дифтерийного токсина, лишённого рецептор-связывающей активности, экзотоксина синегнойной палочки А; процессированных форм экзотоксина синегнойной палочки, у которого отсутствует рецептор-связывающий домен Ia, токсин-рицина, сапорина, диантина, гелонина, трикозантина, противовирусного белка лаконоса (РАР), буганина, протективного антигена сибирской язвы, альфа токсина, абрина, апоптоз-индуцирующих полипептидов.

15. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой токсический полипептид, выбранный из группы, состоящей из дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I), дезоксирибонуклеазы II (ДНКазы II), полипептидов, нацеленных на альфа-тубулин, полипептидов, нацеленных на бета-тубулин, полипептидов, нацеленных на динеин, конъюгатов полипептидов, нацеленных на кинезин, полипептидов, нацеленных на NEDD1, полипептидов, нацеленных на трансформирующий кислый биспиральный белок ТАСС, полипептидов, нацеленных на сверхэкспрессированный ген опухоли толстой кишки и печени cHOG.

16. Фармацевтическая композиция по п.1, где белки выбраны из группы, состоящей из глобулярных белков, гликопротеинов, токсинов, ферментов, антител, фрагментов антител, сконструированного антитела и белковых конструкций, включая однодоменные антитела (sLab), одноцепочечные антитела на основе переменных фрагментов (scFv), антитела, содержащие одноцепочечный переменный и константный фрагменты (ScFv-Fc).

17. Фармацевтическая композиция по п.1, где белок представляет собой бевацизумаб или IgG.

18. Фармацевтическая композиция по п.1, где эффекторная молекула представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из дикого типа p53, дикого типа p21, апоптоз-индуцирующего фактора 1 (AIF1), ASK1, апоптоз-индуцирующего белка (AIP), каспазы-2, каспазы-3, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, Вах, серин-протеазы, Smac, цитохрома с, Аraf-1, апоптина.

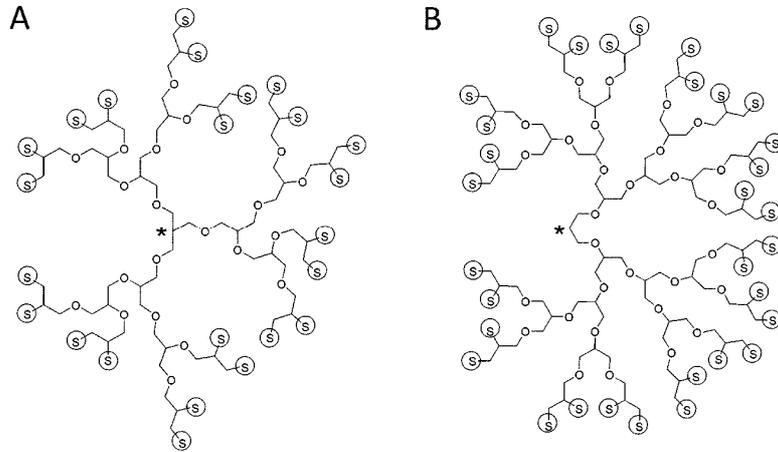
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, где Е направлен против молекул, участвующих в пролиферации и апоптозе опухолевых клеток.

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

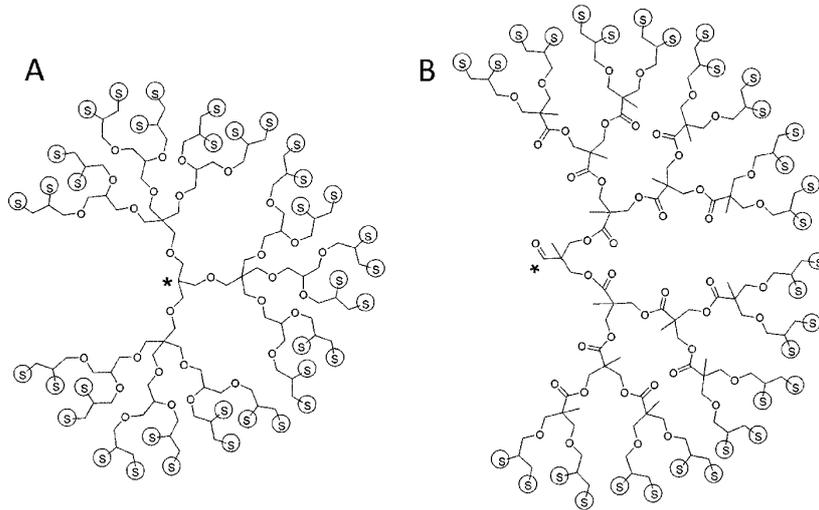
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-20 для лечения злокачественной опухоли.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-20 для (i) лечения заболевания, выбранного из группы, включающей воспаление, аутоиммунное заболевание, метаболическое заболевание и фиброз,

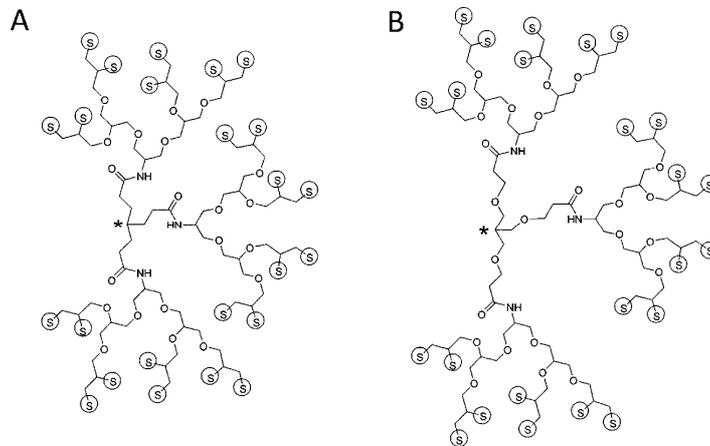
или (ii) антипролиферативного, пропролиферативного, антиапоптотического, проапоптотического, анти-фиброзного, профиброзного, антилипогенного, антидиабетического, иммуностимулирующего и замедляющего старение лечения.



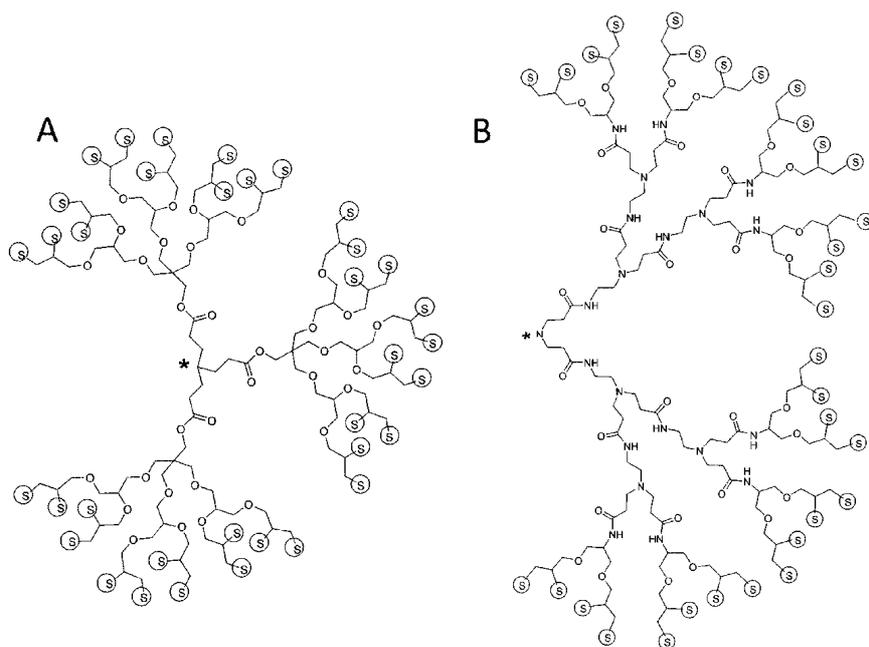
Фиг. 1



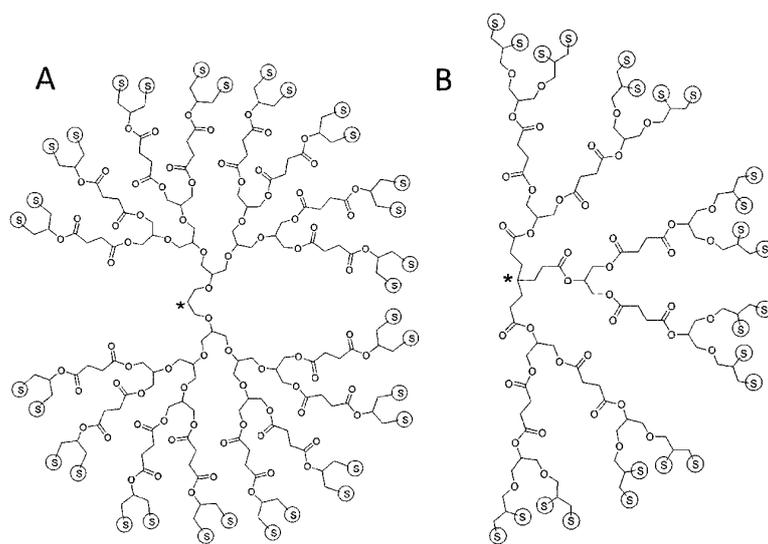
Фиг. 2



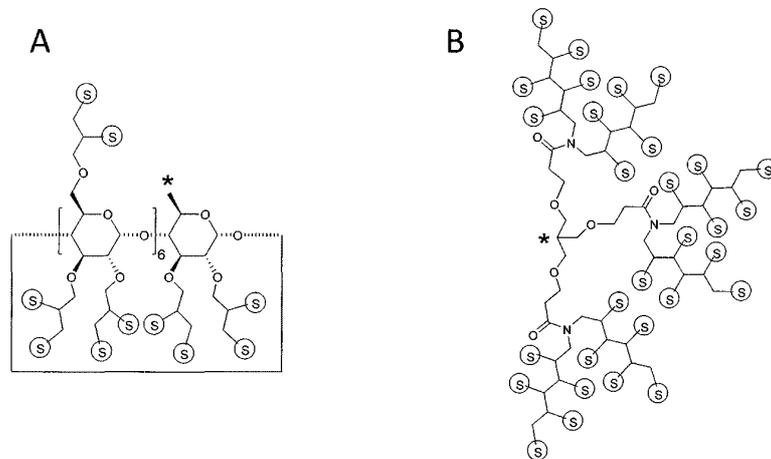
Фиг. 3



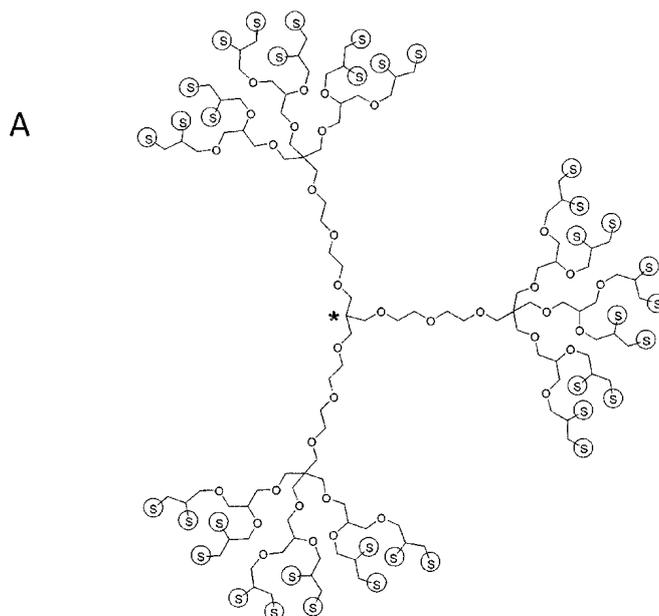
Фиг. 4



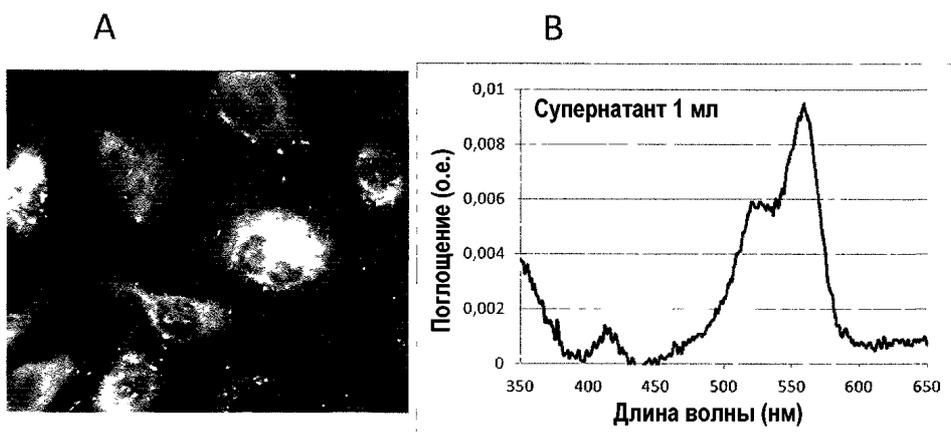
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

