

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037519**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.07(51) Int. Cl. *A61K 31/665* (2006.01)(21) Номер заявки
201791094(22) Дата подачи заявки
2015.11.06**(54) АНАЛОГИ ПРОСТЫХ ЭФИРОВ ФОСФОЛИПИДОВ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ**(31) **62/080,436**(56) **US-A1-20020197306**(32) **2014.11.17****US-A1-20090018357**(33) **US****US-A1-20100286510**(43) **2017.09.29****PUBCHEM, Substance Record for SID**(86) **PCT/US2015/059382****252827261, Create Date 2015-10-15 [retrieved**(87) **WO 2016/081203 2016.05.26****on 11 February 2016]. Retrieved from the**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕЛЛЕКТАР БАЙОСАЙЕНСИЗ,
ИНК. (US)****Internet < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/252827261/version/1#section=Top> > entire****document**(72) Изобретатель:
**Уэйчерт Джейми П., Пинчук
Анатолий, Козак Кевин, Лонджино
Марк, Грудзински Джозеф, Титз
Бенджамин, Пак Чором, Стеле Натан
(US)**(74) Представитель:
**Дементьев В.Н., Клюкин В.А.,
Христофоров А.А., Угрюмов
В.М., Лыгу Т.Н., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В. (RU)**

(57) Изобретение направлено на терапевтические соединения, представляющие собой аналоги простых эфиров фосфолипидов в качестве носителей лекарственных средств, которые можно нацеливать на раковые клетки и раковые стволовые клетки. Кроме того, изобретение направлено на композиции, содержащие эти терапевтические соединения, и на способы лечения рака, включающие введение этих терапевтических соединений. Терапевтическое соединение имеет формулу А-В-Д, где

А представлено формулой (I)

$$W-(CH_2)_n-O-\overset{\ominus}{P}(=O)(\overset{\ominus}{O})-OCH_2CH_2N(CH_3)_3 \quad (I), \text{ или формулой (II)}$$

$$W-(CH_2)_n-OCH_2CH_2-O-\overset{\ominus}{P}(=O)(\overset{\ominus}{O})-OCH_2CH_2N(CH_3)_3 \quad (II), \text{ или}$$

формулой (III)

$$W-(CH_2)_n-O-\overset{\ominus}{P}(=O)(\overset{\ominus}{O})-OCH_2CH_2-O-\overset{\ominus}{P}(=O)(\overset{\ominus}{O})-OCH_2CH_2N(CH_3)_3 \quad (III), \text{ или их комбинацией.}$$
B1**037519****037519****B1**

Уровень техники

В 2012 г. у 14,1 млн людей во всем мире был диагностирован рак, и 8,2 млн людей умерли от рака. В Соединенных Штатах Америки примерно 40% всех людей в течение их жизни будет поставлен диагноз рак. Несмотря на получение наилучшего доступного лечения, 44% этих американцев умрут от рака.

Рак представляет собой результат неограниченного деления клеток. Здоровые клетки имеют контрольные точки, которые предотвращают неограниченное деление клеток. Несколько примеров этих контрольных точек представляют собой доступность питания, повреждения ДНК и контактное ингибирование (то есть клетка вступает в контакт с другой клеткой). Кроме того, большинство клеток могут реплицироваться только ограниченное число раз и, таким образом, они запрограммированы на гибель после конкретного количества делений клетки.

Рак является результатом преодоления клетками этих встроенных контрольных точек и бесконтрольной пролиферации. Эта неконтролируемая пролиферация приводит к образованию опухоли. Существуют два типа опухолей, доброкачественные и злокачественные. Доброкачественные опухоли способны преодолевать природные границы между типами тканей. Злокачественные опухоли, с другой стороны, способны к инвазии в соседние ткани или к поступлению в кровотоки и метастазированию в другое положение. Только злокачественные опухоли считаются раковыми. Именно их способность к инфильтрации и метастазированию делает рак таким смертельным заболеванием.

Еще сильнее осложняя борьбу против рака, злокачественные опухоли имеют различные типы клеток. Один из особенно проблематичных их типов представляет собой раковые стволовые клетки ("CSC"). CSC способны возобновляться и дифференцироваться в виде различных типов раковых клеток, обнаруживаемых в злокачественной опухоли. Таким образом, CSC представляют собой главный фактор для способности опухоли к метастазированию. CSC часто выживают при радиационной терапии и химиотерапии. Предполагается, что рецидив рака после радиационной терапии и химиотерапии является результатом неспособности радиационной терапии и химиотерапии уничтожить все CSC, в сочетании со способностью CSC к образованию новой опухоли.

Особенно проблематичным типом рака является рак головного мозга. Раковые заболевания головного мозга, такие как глиомы высокой степени, часто лечат с помощью хирургии с последующей радиационной терапией. Хирургия опухолей головного мозга часто является очень сложной. Хирург должен удалить опухоль без повреждения любой соседней ткани головного мозга, которое могло бы привести к физической или умственной инвалидности. Часто хирург не имеет возможности удаления периферии опухоли, которая находится в контакте со здоровыми тканями. Для уничтожения этих оставшихся раковых клеток часто используют радиационную терапию. Однако дозы облучения ограничиваются потенциальным повреждением здоровых тканей головного мозга. К сожалению, рак головного мозга является обычно стойким к химиотерапии. Эта невосприимчивость по большей части приписывается гематоэнцефалическому барьеру ("BBB"). BBB представляет собой физический барьер, который отделяет жидкость, окружающую головной мозг, от клеток крови и других компонентов в кровотоке. Большинство противораковых лекарственных средств не могут преодолеть BBB.

Один из способов лечения рака головного мозга заключается в ингибировании роста новых кровеносных сосудов, которые необходимы для увеличения размеров опухоли. Бевацизумаб, распространяемый на рынке под торговым наименованием Avastin® (Avastin представляет собой зарегистрированное торговое наименование Genentech, Inc.), используется для остановки и даже обращения васкуляризации опухоли. Однако Rich J. and colleagues, Canc Res, 2006, 66, 7843 обнаружили, что, когда Avastin® используют для лечения опухоли головного мозга, развившейся из стволовых клеток глиомы, это приводит в результате к гипоксии и понижению pH. Sathornsumetee S., Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma, Neuro-Oncol, 2010, Dec, 12(12), 1300-1310. Как гипоксия, так и низкие pH, как известно, вызывают размножение CSC и могут способствовать рецидиву опухоли, обусловленному CSC.

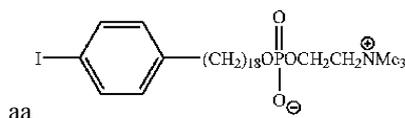
Химиотерапия представляет собой термин, используемый для описания конкретного типа лечения рака, которое включает использование цитотоксичных противораковых лекарственных средств. Цитотоксичные лекарственные средства, используемые во время химиотерапии, можно разделить на несколько основных категорий, включающих алкилирующие агенты, антиметаболиты, противораковые антибиотики, ингибиторы топоизомераз и митотические ингибиторы. Цитотоксичные противораковые лекарственные средства, как правило, вызывают приостановку деления клеток и таким образом влияют как на здоровые ткани, так и на раковые ткани. Алкилирующие агенты останавливают деление раковых клеток посредством повреждения ДНК раковой клетки. Некоторые распространенные алкилирующие агенты, используемые для лечения рака, представляют собой азотистый иприт (например, циклофосфамид (Cytosan®); Cytosan представляет собой зарегистрированное торговое наименование Baxter International), нитрозомочевина, алкилсульфонаты, триазины и этиленимины. Платиновые лекарственные средства, такие как цисплатин и карбоплатин, работают подобно алкилирующим агентам.

Антиметаболиты останавливают деление раковых клеток посредством ингибирования синтеза ДНК и РНК. Некоторые распространенные антиметаболиты, используемые для лечения рака, представляют

собой 6-меркаптопурин, гемцитабин (Gemzar®; Gemzar представляет собой зарегистрированное торговое наименование Eli Lilly and Company), метотрексат и пеметрексед (Alimta®; Alimta представляет собой зарегистрированное торговое наименование Eli Lilly and Company). Ингибиторы топоизомераз останавливают деление раковых клеток посредством ингибирования действия ферментов топоизомераз при разделении ДНК для репликации. Некоторые распространенные ингибиторы топоизомераз представляют собой топотекан, иринотекан, эпозид и тенипозид. Митотические ингибиторы останавливают деление раковых клеток посредством ингибирования ключевых ферментов деления клеток. Некоторые распространенные митотические ингибиторы представляют собой таксаны (например, паклитаксел (Taxol®; Taxol представляет собой зарегистрированное торговое наименование Bristol-Myers Squibb Company) и доцетаксел (Taxotere®; Taxotere представляет собой зарегистрированное торговое наименование Aventis Pharma SA)), эпителины и алкалоиды винка.

Один из недостатков всех этих противораковых лекарственных средств представляет собой повреждения, которые они вызывают в здоровых тканях. Поскольку лекарственные средства лечат рак посредством ингибирования нормального функционирования клеток, здоровые ткани, которые также находятся в постоянном делении, такие как клетки крови, слизистые поверхности и кожа, также могут значительно повреждаться. Это повреждение приводит в результате к значительной смертности и может ограничивать то количество химиотерапевтического средства, которое может доставляться безопасно. Примеры побочных воздействий, которые возникают во время лечения химиотерапии, включают низкое число форменных элементов крови, выпадение волос, мышечную и суставную боль, тошноту, рвоту, диарею, язвы во рту, жар и лихорадку. Для решения этой проблемы разрабатывают лекарственные средства, которые влияют на белки и клеточные функции, которые существуют только в раковых клетках. Некоторые из этих специфичных лекарственных средств против рака представляют собой иматиниб (Gleevec®; Gleevec представляет собой зарегистрированное торговое наименование Novartis AG), гефинитиб (Iressa®; Iressa представляет собой зарегистрированное торговое наименование AstraZeneca UK Limited), сунитиниб (Sutent®; Sutent представляет собой зарегистрированное торговое наименование C.P. Pharmaceuticals, International C.V.) и бортезомиб (Velcade®; Velcade представляет собой зарегистрированное торговое наименование Millennium Pharmaceuticals, Inc.). Однако эти лекарственные средства не одобрены для лечения всех типов рака, и они повсеместно ассоциируются с развитием резистентности к лечению. Таким образом, в данной области имеется необходимость в носителях для доставки противораковых лекарственных средств, которые могут доставлять действенные и эффективные противораковые лекарственные средства широкого спектра в раковые клетки, включая CSC, в то же время предотвращая существенное потребление лекарственного средства здоровыми клетками. В дополнение к этому, носитель для доставки противораковых лекарственных средств должен обладать способностью к преодолению BBB и к доставке противоракового лекарственного средства в раковые клетки головного мозга.

В настоящее время имеется несколько химических соединений, которые преимущественно нацелены на раковые клетки. Одно из таких соединений представляет собой CLR1404. В целом, CLR1404 представляет собой перспективное новое опухолеселективное диагностическое радиофармацевтическое средство, используемое для мониторинга реакции на лечение, для нескольких режимов лечения опухолей. Радиойодированный CLR1404, аналог простого эфира фосфолипидов ("PLE") второго поколения со следующей структурой:



демонстрирует заметную селективность по отношению к опухоли на ксенотрансплантате 55/60, на ортотопических и трансгенных животных моделях рака и на животных моделях, полученных из раковых стволовых клеток, что делает сердцевинную молекулу идеальной платформой для носителя, предназначенного для доставки противораковых лекарственных средств; см. документы патент США № 8535641; публикацию заявки на патент США № 2014/0030187 и Weichert, J.P., et al., Alkylphosphocholin analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy, Sci Transl Med, 2014, Jun 11, 6(240), 240ra75; каждый из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

Неизвестно, является ли соединение, которое селективно секвестрируется и удерживается раковыми клетками и раковыми стволовыми клетками, способным к доставке противоракового лекарственного средства в эти же клетки. Кроме того, неизвестно, является ли это соединение способным также к транспортировке противораковых лекарственных средств через BBB для лечения раковых заболеваний головного мозга. Наконец, неизвестно, может ли это соединение или соединения, подобные ему, вызывать удержание раковыми клетками противоракового лекарственного средства в достаточных количествах и в течение достаточного периода времени для разрушения опухоли и предотвращения дальнейшего роста и метастазирования. Настоящее изобретение адаптирует сердцевинную молекулу CLR1404 для применения в качестве носителя для доставки противораковых лекарственных средств, который может нацеливать противораковое лекарственное средство на раковые клетки и раковые стволовые клетки, вклю-

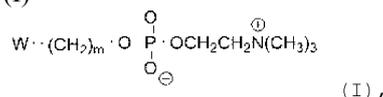
чая раковые клетки головного мозга. Кроме того, соединения по настоящему изобретению удерживаются в раковых клетках.

Сущность изобретения

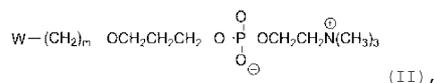
Настоящее изобретение направлено на терапевтические соединения, которые можно нацеливать на раковые клетки и раковые стволовые клетки, включая опухолевые клетки головного мозга. Настоящее изобретение также направлено на терапевтические соединения, которые могут секвестрироваться и удерживаться раковыми клетками и раковыми стволовыми клетками, включая опухолевые клетки головного мозга, в достаточном количестве и с достаточной продолжительностью для лечения рака и предотвращения метастазирования и рецидива.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение формулы A-B-D,

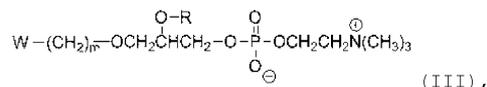
где A представлено формулой (I)



или формулой (II)

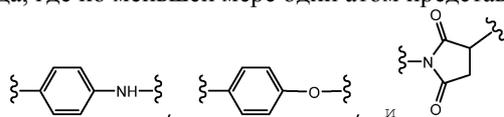


или формулой (III)



или их комбинацией,

где W выбирают из группы, состоящей из фенила, C₁-C₆-алкила, C₃-C₆-циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего циклическую группу из 3-6 атомов, выбранных из группы, состоящей из углерода, азота, серы, фосфата и кислорода, где по меньшей мере один атом представляет собой углерод



где R представляет собой H или C₁-C₂₄-алкил и где m представляет собой целое число от 12 до 24;

B представляет собой линкер, выбранный из связи и соединения формулы (IV) Y-(CH₂)_n-Z (IV),

где Y связывается с A;

Z связывается с D;

Y выбирают из группы, состоящей из связи, O, NH, C=O, NHSO₂O и OC(=O)O;

Z выбирают из группы, состоящей из O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂ и -S-S-; и

n представляет собой целое число от 0 до 6; и

D представляет собой противораковое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из паклитаксела, иринотекана, топотекана, гемцитабина, цисплатина, гелданамицина и мертанзина.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение,

где A представляет собой соединение формулы (I), W представляет собой  и m равно 18;

B представляет собой соединение формулы (IV), где Y представляет собой C=O и Z представляет собой C=O, C(=O)NH или C(=O)O и n равно 3 или 4; и

D представляет собой паклитаксел.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение,

где A представляет собой соединение формулы (I), где W представляет собой  и m равно 18;

B представляет собой связь или соединение формулы (IV), где Y представляет собой C=O, Z представляет собой NH и n равно 1 или 3; и

D представляет собой гелданамицин.

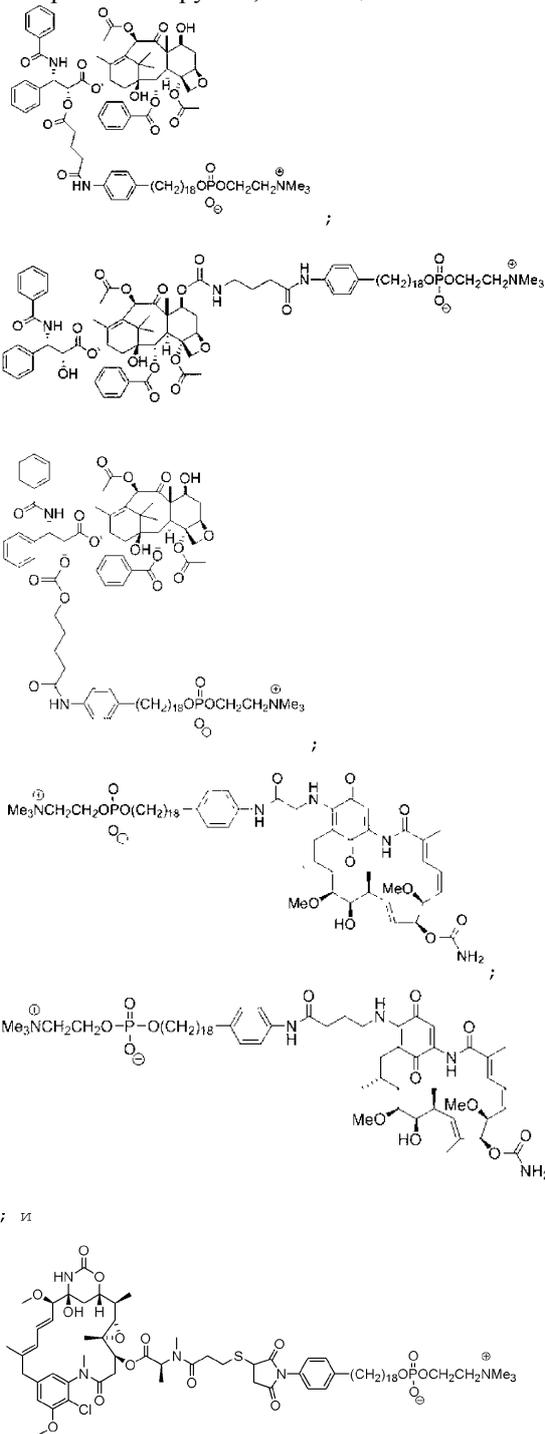
В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение,

где A представляет собой соединение формулы (I), где W представляет собой  и m равно 18;

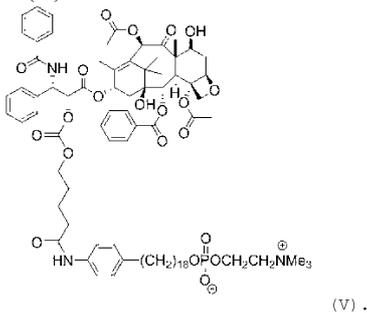
B представляет собой связь и

D представляет собой мертанзин.

В другом, более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение, выбранное из группы, состоящей из



В другом, более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на терапевтическое соединение формулы (V)



В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую соединение по настоящему изобретению в сочетании с одной или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения рака, включающий введение эффективного количества терапевтического соединения по настоящему изобретению пациенту с раковым заболеванием.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение предлагает способ лечения рака, включающий введение эффективного количества терапевтического соединения по настоящему изобретению пациенту с раковым заболеванием, где рак содержит раковые стволовые клетки.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способ лечения рака, включающий введение эффективного количества терапевтического соединения по настоящему изобретению пациенту с раковым заболеванием, где рак является рецидивирующим.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - аналоги простых эфиров фосфолипидов ("PLE") секвестрируются липидными рафтами.

Фиг. 2 - преимущественное потребление CLR1501 раковыми клетками. Сравнение потребления CLR1501 линиями раковых клеток (A) и (C)-(F) с нормальными клетками в (B). (A) Клетки рака почек (Saki-2). (B) Нормальные фибробласты кожи человека. (C) клетки рака яичников (OVcar-3). (D) Клетки рака поджелудочной железы (Panc-1). (E) Клетки меланомы (A-375). (F) Клетки рака предстательной железы (PC-3).

Фиг. 3 - пролонгированное удерживание ^{131}I -CLR1404 ксенотрансплантатом опухоли RL-251 человека у мыши линии SCID.

Фиг. 4 - детектирование глиомы C6 в головном мозге крысы с использованием ^{125}I -NM404. (A) Изображение Bioscan головного мозга крысы, контроль с плацебо. (B) Изображение Bioscan головного мозга крысы из (A), наложенное на цифровую фотографию, показывающую фоновые уровни ^{125}I -NM404 в нормальных тканях головного мозга. (A') Цифровая фотография головного мозга крысы с C6-глиомой через 4 дня после инъекции ^{125}I -NM404. (B') Изображение Bioscan головного мозга крысы из (A'). (C) Положение и согласованные по размерам изображения (A') и (B'), наложенные друг на друга, чтобы показать интенсивную локализацию NM404 в опухоли. (D') Образец, окрашенный H&E, подтверждающий присутствие опухоли.

Фиг. 5 - потребление ^{124}I -CLR1404 в широком наборе злокачественных опухолей. (A)-(I) представляют собой модели грызунов с ксенотрансплантатами рака человека. (J)-(M) представляют собой модели рака грызунов. (A) Ортопическая глиома U87 (крысы). (B) Рак толстой кишки HCT-116. (C) Рак толстой кишки HT-29. Стрелка показывает положение опухоли. (D) Рак молочной железы MDA-MB-231. Стрелка показывает положение опухоли. (E) Рак предстательной железы PC-3. (F) Метастатический PC-3. (G) Ксенотрансплантат рака большеберцовой кости PC-3. (H) Рак поджелудочной железы VxPC3. Нижняя стрелка показывает положение опухоли. Верхняя стрелка показывает метастазы в печени. (I) Саркома Юинга. Стрелка показывает положение опухоли. (J) Рак мочевого пузыря мыши SV40. (K) Рак молочной железы мыши 4T1. (L) Рак поджелудочной железы мыши с-тус. (M) Рак головного мозга крысы CNS-1.

Фиг. 6 - детектирование опухолей немелкоклеточного рака легких ("NSCLC") у пациента человека с использованием ^{131}I -CLR1404. (A) показывает изображения, сделанные с помощью гамма-камеры, Пациента 1 в дни 4 и 11 после инъекции ^{131}I -CLR1404. Отметим интенсивное и пролонгированное удерживание CLR1404 в опухолях NSCLC (стрелки). (B и C) показывают положение и размер фокального 3-см очага в левом легком (A) и большую инфильтрационную массу в правом легком (B) (стрелки). (D и E) показывают планарные изображения при радиационной медицине для всего тела Пациента 2 через 1, 2 и 4 дня после IV (внутривенного введения) введения ^{131}I -CLR1404. (F и G) показывают изображения аксиального (F) и коронального (G) CT сканирования, показывающие положение большой 6-см опухоли NSCLC (стрелки).

Фиг. 7 - детектирование 3 ранее неизвестных метастаз опухоли головного мозга у пациента с NSCLC с использованием ^{124}I -CLR1404. Стрелки показывают положение опухолей на изображениях, полученных с использованием PET/CT, после потребления ^{124}I -CLR1404 раковыми клетками.

Фиг. 8 - детектирование рецидива опухоли с метастазами в правой передней области серпа мозга с использованием ^{124}I -CLR1404. (A) MRI головного мозга после радиационной хирургии. Стрелка показывает очаг, который интерпретируется как радиационный некроз. (B) Изображение PET с использованием ^{124}I -CLR1404 показывает потребление ^{124}I -CLR1404 очагом. (C) MRI головного мозга через 8 месяцев после стереотаксической радиационной хирургии показывает увеличение размера очага, показывающее возможный рецидив.

Фиг. 9 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для MDA-MB-468. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 10 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для NCI-H1299. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 11 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для NCI-H460. (A) Свободный паклитаксел, (B)

CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 12 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для Саран-2. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 13 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для MiaPaCa-1. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 14 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для HT29. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 15 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для HCT116. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Фиг. 16 - IC₅₀ конъюгаты PLE-паклитаксел для PC-3. (A) Свободный паклитаксел, (B) CLR1601 и (C) CLR1603.

Подробное описание изобретения

Определения.

Как используется в настоящем документе, термин "лечение" включает как превентивное лечение, так и лечение, вызывающее ремиссию расстройства, включая уменьшение, подавление и ингибирование развития или рецидива рака. Как используется в настоящем документе, термины "уменьшение", "подавление" и "ингибирование" имеют свое повсеместно понимаемое значение снижения или понижения. Как используется в настоящем документе, термин "развитие" означает увеличение области или тяжести развития, роста или ухудшения. Как используется в настоящем документе, термины "рецидив" и "рецидивирующий" относятся к возобновлению заболевания после ремиссии.

Как используется в настоящем документе, термин "введение" относится к приведению пациента, ткани, органа или клетки в контакт с противораковым соединением по настоящему изобретению. Как используется в настоящем документе, введение может осуществляться *in vitro* (то есть в пробирке для исследования) или *in vivo*, (то есть в клетке или ткани живых организмов, например людей). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает введение соединений, пригодных для использования по настоящему изобретению, пациенту или пациенту. Термины "субъект" или "пациент", используемые в настоящем документе эквивалентно, относятся к млекопитающему, предпочтительно к человеку, который: (1) либо имеет расстройство, которое можно облегчить или вылечить посредством введения противоракового вещества с использованием соединения PLE, (2) либо является восприимчивым к расстройству, которое можно предотвращать посредством введения противоракового соединения по настоящему изобретению.

Как используется в настоящем документе, термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для оказания желаемого биологического воздействия, такого как полезный результат, включая, без ограничения, предотвращение, уменьшение, облегчение или устранение признаков или симптомов заболевания или расстройства. Таким образом, общее количество каждого активного компонента фармацевтической композиции или способа является достаточным для того, чтобы показать значимую выгоду для пациента. Таким образом, "эффективное количество" будет зависеть от того контекста, в котором оно вводится. Эффективное количество может вводиться в виде одного или нескольких профилактических или терапевтических введений.

Как используется в настоящем документе, термин "терапевтическое соединение" относится к любому химическому соединению, которое может обеспечить лечение рака.

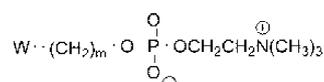
Как используется в настоящем документе, термин "рак" относится к любому заболеванию, которое происходит в результате неконтролируемого деления клеток, которые могут метастазировать.

Термины "лекарственное средство для химиотерапии" "противораковое лекарственное средство" и "противоопухолевое лекарственное средство" используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

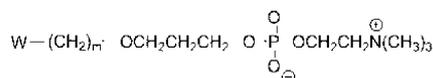
Термин "злокачественная опухолевая клетка" и "раковая клетка" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Термин "злокачественная опухолевая стволовая клетка" и "раковая стволовая клетка" используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

Как используется в настоящем документе, термин "композиция" предназначен для охвата продукта, содержащего указанные ингредиенты в указанных количествах, а также любого продукта, который получается в результате прямого или косвенного объединения указанных ингредиентов в указанных количествах.

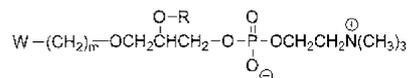
Как используется в настоящем документе, термин "A" относится к простому эфиру фосфолипидов формулы



или



или



Как используется в настоящем документе, термин "W" относится к арилу, C₁-C₆-алкилу, алкенилу, необязательно замещенному C₃-C₆-циклоалкилу и необязательно замещенному C₃-C₆-гетероциклоалкилу.

Как используется в настоящем документе, термин "арил" относится к ароматическому кольцу, содержащему фенильную группу.

Как используется в настоящем документе, термин "алкил" относится к разветвленному или прямому алкилу, состоящему из насыщенной углеводородной группы из 1-24 атомов углерода (C₁-C₂₄), если не указано иного. Алкильная группа может быть циклической или ациклической.

Как используется в настоящем документе, термин "алкенил" относится к двойной связи углерод-углерод.

Как используется в настоящем документе, термин "циклоалкил" относится к циклической алкильной группе из 3-24 атомов углерода (C₃-C₂₄).

Как используется в настоящем документе, термин "гетероциклоалкил" относится к циклической группе из 3-24 атомов (C₃-C₂₄), выбранных из углерода, азота, серы, фосфата и кислорода, где по меньшей мере один атом представляет собой углерод.

Как правило, термин "замещенный", предшествует ли ему термин "необязательно" или нет, означает, что один или несколько атомов водорода в указанном остатке заменены соответствующим заместителем. Если не указано иного, "необязательно замещенная" группа может иметь соответствующий заместитель в каждом замещаемом положении группы, и когда несколько положений в любой данной структуре может быть замещен несколькими заместителями, выбранными из указанной группы, заместители в каждом положении могут быть либо одинаковыми, либо различными. Сочетания заместителей, предусматриваемые настоящим изобретением, предпочтительно являются такими, которые приводят в результате к образованию стабильных или химически возможных соединений.

Как используется в настоящем документе, термин "R" относится к водороду (H) или алкилу.

Как используется в настоящем документе, термин "m" относится к целому числу от 12 до 24.

Как используется в настоящем документе, термин "n" относится к целому числу от 0 до 6.

Как используется в настоящем документе, термин "B" относится к линкерному соединению. Как используется в настоящем документе, термин "линкерное соединение" относится к любому химическому соединению или соединениям, которые могут образовывать химическую связь с двумя или более другими различными химическими соединениями, таким образом, что все соединения образуют одно большее соединение. В одном из вариантов осуществления линкерное соединение представляет собой связь. При образовании соединения большего размера может использоваться множество линкерных соединений. В конкретных вариантах осуществления термин линкерное соединение представляет собой связь или соединение формулы Y-(CH₂)_n-Z.

Как используется в настоящем документе, термин "Y" относится к связи, O, NH, C=O, NHSO₂O или OC(=O)O.

Как используется в настоящем документе, термин "Z" относится к O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂ и -S-S-.

Как используется в настоящем документе, термин "D" относится к любому противораковому лекарственному средству, известному или разрабатываемому в настоящее время.

Как определено в настоящем документе, термин "изомер" включает, но, не ограничивается этим, оптические изомеры и аналоги, структурные изомеры и аналоги, конформационные изомеры и аналоги, и тому подобное. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение охватывает использование различных оптических изомеров по настоящему изобретению. Специалистам в данной области будет очевидным, что противораковые соединения, пригодные для использования по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один стереогенный центр. Соответственно соединения, используемые в способах по настоящему изобретению, могут существовать и выделяться в оптически активных или рацемических формах. Некоторые соединения могут также демонстрировать полиморфизм.

Необходимо понимать, что настоящее изобретение может охватывать применение любой рацемической, оптически активной, полиморфной или стереоизомерной формы или их смесей, и эта форма обладает свойствами пригодными для использования при лечении состояний, связанных с раком, описанных и заявленных в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления противораковые соединения могут включать чистые (R)-изомеры. В другом варианте осуществления противораковые соединения могут включать чистые (S)-изомеры. В другом варианте осуществления соединения могут включать смесь (R) и (S) изомеров. В другом варианте осуществления соединения могут включать рацемическую смесь, содержащую как (R), так и (S) изомеры. В данной области хорошо известно, как приготовить оптически активные формы (например, посредством выделения рацемической формы с помощью технологий перекристаллизации, посредством синтеза из оптически активных исходных материалов, посредством хирального синтеза или посредством хроматографического разделения с использованием хиральной

стационарной фазы).

Настоящее изобретение включает применение фармацевтически приемлемых солей аминокзамещенных соединений и органических и неорганических кислот, например лимонной кислоты и хлористоводородной кислоты. Настоящее изобретение также включает N-оксиды аминокзаместителей соединений, описанных в настоящем документе. Фармацевтически приемлемые соли могут также быть получены из фенольных соединений посредством обработки неорганическими основаниями, например гидроксидом натрия. Также сложные эфиры фенольных соединений могут быть получены с помощью алифатических и ароматических карбоновых кислот, например сложные эфиры уксусной кислоты и бензойной кислоты. Как используется в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соединению, полученному из основного соединения, которое достигает по существу такого же фармацевтического воздействия, как и основное соединение.

Кроме того, настоящее изобретение включает производные противораковых соединений. Термин "производные" включает, но, не ограничивается этим, производные простых эфиров, кислотные производные, амидные производные, сложноэфирные производные, и тому подобное. В дополнение к этому, настоящее изобретение дополнительно включает способы с применением гидратов противораковых соединений. Термин "гидрат" включает, но, не ограничивается этим, гемигидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, и тому подобное.

Кроме того, настоящее изобретение включает метаболиты противораковых соединений. Термин "метаболит" означает любое вещество, полученное из другого вещества посредством метаболизма или метаболического процесса.

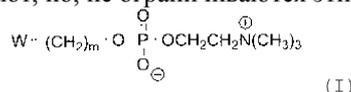
Раковые заболевания, которые можно лечить с помощью соединений по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим: рак молочной железы, включая рак молочной железы у мужчин; раковые заболевания пищеварительной/желудочно-кишечной системы, включая рак анального канала, рак аппендикса, внепеченочный рак желчного протока, желудочно-кишечную карциноидную опухоль, рак толстой кишки, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта ("GIST"), инсулиномы, первичный рак печени взрослых, рак печени детей, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак тонкой кишки и рак желудка (желудочно-кишечного тракта); эндокринные и нейроэндокринные раковые заболевания, включая аденокарциному поджелудочной железы, аденокарциному, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, карциному Меркеля, немелкоклеточную нейроэндокринную опухоль легких, мелкоклеточную нейроэндокринную опухоль легких, рак паращитовидной железы, феохромоцитому, опухоль гипофиза и рак щитовидной железы; раковые заболевания глаз, включая интраокулярную меланому и ретинобластому; рак мочеполовой системы, включая рак мочевого пузыря, рак почек (почечноклеточный), рак полового члена, рак предстательной железы, рак переходных клеток почечных лоханок и рак мочеточников, рак яичка, рак уретры и опухоль Вильмса; герминогенный рак, включая рак центральной нервной системы у детей, экстракраниальные герминогенные опухоли у детей, внегонаданальная опухоль зародышевых клеток, опухоль зародышевых клеток яичников и рак яичек; гинекологические раковые заболевания, включая рак шейки матки, эндометриальный рак, гестационную трофобластическую опухоль, эпителиальный рак яичников, опухоль зародышевых клеток яичников, саркому матки, вагинальный рак и вульварный рак; раковые заболевания головы и шеи, включая гипоглоточный рак, рак гортани, губ и рак полости рта, метастатический рак шеи со сквамозными клетками со скрытым возникновением, рак ротовой полости, назофарингиальный рак, орофарингиальный рак, рак параназальных синусов и носовой полости, рак паращитовидной железы, фарингиальный рак, рак слюнных желез и рак горла; лейкемии, включая острую лимфобластную лейкемию взрослых, острую лимфобластную лейкемию детей, острую миелоидную лейкемию взрослых, острую миелоидную лейкемию детей, хроническую лимфоцитарную лейкемию, хроническую миелоидную лейкемию и волосатоклеточный лейкоз; лимфомы, включая лимфому, связанную со СПИД, Т-клеточную лимфому кожи, лимфому Ходжкина взрослых, лимфому Ходжкина детей, лимфому Ходжкина беременных, фунгоидный микоз, лимфому не-Ходжкина взрослых, лимфому не-Ходжкина детей, лимфому не-Ходжкина беременных, первичную лимфому центральной нервной системы, синдром Сезари и макроглобулинемию Вальденстрема; скелетно-мышечные раковые заболевания, включая саркому Юинга, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистiocитому костей, рабдомиосаркому детей и саркому мягких тканей; неврологические раковые заболевания, включая опухоль головного мозга взрослых, опухоль головного мозга детей, астроцитому, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, краниофарингиому, эпендимому, нейробластому, первичную лимфому центральной нервной системы (CNS); респираторные/торакальные раковые заболевания, включая немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, злокачественную мезотелиому, тимому и тимусную карциному; и раковые заболевания кожи, включая саркому Капоши, меланому и карциному сквамозных клеток.

Соединения формулы (I) по настоящему изобретению, как продемонстрировано, секвестрируются раковыми стволовыми клетками; см. Weichert J.P., et al. (2014) at 2, фиг. 2 (демонстрируется, что CLR-1501, флуоресцентный аналог CLR1404, имеет повышенное потребление стволоподобными клетками

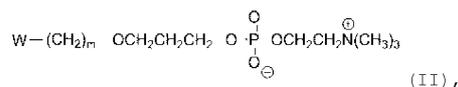
глиобластомы человека и культивируемыми в сыворотке клетками глиобластомы человека по сравнению с нормальными астроцитами человека и фетальными нервными стволовыми клетками человека). Раковые стволовые клетки ассоциируются с большинством главных типов рака, если не со всеми ими. Гипоксия опухоли стимулирует размножение раковых стволовых клеток, приводя к повышению стойкости и метастатического потенциала. Как таковые, раковые стволовые клетки ассоциируются со стойкостью к химиотерапии, с повторным ростом опухолей и метастазированием после химиотерапии и радиационной терапии. Таким образом, соединения по настоящему изобретению обладают потенциалом для лечения различных форм рака, которые, как показано, являются стойкими по отношению к традиционным режимам терапии.

Соединения по настоящему изобретению

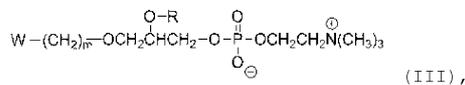
Носители для доставки лекарственных средств, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению, включают, но, не ограничиваются этим, соединения формулы (I)



или формулы (II)



или формулы (III)



или их комбинации, где W выбирают из группы, состоящей из арила, C₁-C₆-алкила, алкенила, обязательно замещенного C₃-C₆-циклоалкила и необязательно замещенного C₃-C₆-гетероциклоалкила, где R представляет собой H или алкил и m представляет собой целое число от 12 до 24.

Основа селективного нацеливания на опухоли соединений по настоящему изобретению лежит в различиях между плазматическими мембранами раковых клеток и большинства нормальных клеток. Конкретно, мембраны раковых клеток сильно обогащены "липидными рафтами". Раковые клетки имеют в пятьдесят раз больше липидных рафтов, чем здоровые клетки. Липидные рафты представляют собой специальные области фосфолипидного бислоя мембраны, которые содержат высокие концентрации холестерина и сфинголипидов и служат для организации поверхности клетки и внутриклеточных сигнальных молекул (например, фактора роста и рецепторов цитокинов, пути передачи сигналов выживания фосфатидилинозитол 3-киназы (PI3K)/Akt). Данные говорят, что липидные рафты служат в качестве порталов входа для PLE. Отмеченная селективность этих соединений по отношению к раковым клеткам по сравнению с нераковыми клетками приписывается высокому сродству PLE к холестерину и избытию обогащенных холестерином липидных рафтов в раковых клетках. Ключевая роль, которую играют липидные рафты, подчеркивается тем фактом, что разрушение архитектуры липидных рафтов подавляет потребление PLE в раковых клетках. Показано, что потребление PLE уменьшается на 60%, когда формирование липидных рафтов блокируется (см. пример 2 и фиг. 1).

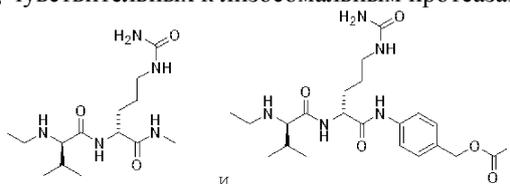
Предварительные результаты, полученные более чем на 55 моделях ксенотрансплантатов и спонтанных опухолей, с универсальностью показывают, что CLR1404 подвергается селективному потреблению и пролонгированному удерживанию в опухолях. Поскольку агент метаболизируется до некоторой степени в печени, авторы исключили раннюю оценку соединения на моделях опухоли печени из-за высоких фоновых уровней радиоактивности в печени.

CLR1404 представляет собой PLE. Результаты, полученные на различных моделях опухолей, показывают, что CLR1404 секвестрируется и селективно удерживается раковыми клетками и раковыми стволовыми клетками. Фактически, как показано, CLR1404 остаются в раковых клетках в течение до 20 дней. См. фиг. 3. CLR1404 локализуется как в первичных, так и в метастатических очагах независимо от анатомического положения, включая те, которые находятся в лимфатических узлах; см. примеры 3-8. Высокая avidность опухоли по сравнению с фоном и селективность CLR1404 по отношению к опухоли говорят о том, что сердцевинная молекула хорошо приспособлена для использования в качестве носителя для доставки противоракового лекарственного средства.

Линкерные соединения, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению, включают любой химический линкер, который может связывать носитель для доставки лекарственных средств по настоящему изобретению с противораковым лекарственным средством по настоящему изобретению. Линкерные соединения, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению, включают как расщепляемые, так и нерасщепляемые линкеры. В одном из вариантов осуществления линкерные соединения, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению, включают, но, не ограничиваются этим, аминобутирамид, аминокислоты, полуамид глутаровой кислоты, дикарбоновые кислоты, карбаминовые кислоты, карбонил, 9,10-антрацендикарбоновую кислоту, бифенил-3,3',5,5'-тетракарбоновую кислоту, бифенил-3,4',5-

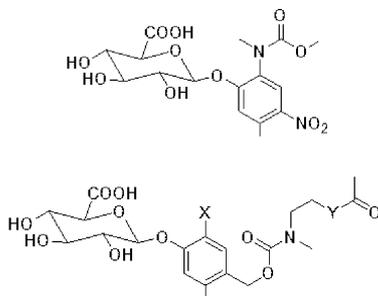
трикарбоновую кислоту, 5-бромизофталевою кислоту, 5-циано-1,3-бензолдикарбоновую кислоту, 2,2'-диамино-4,4'-стильбендикарбоновую кислоту, 2,5-диаминотерефталевою кислоту, 2,5-дигидрокситерефталевою кислоту, 5-этинил-1,3-бензолдикарбоновую кислоту, 2-гидрокситерефталевою кислоту, имидазол, 2-метилимидазол, 2,6-нафталиндикарбоновую кислоту, дигидрат щавелевой кислоты, терефталевою кислоту, [1,1':4',1'']терфенил-3,3'',5,5''-тетракарбоновую кислоту, 3,3',5,5'-тетракарбоксидифенилметан, 1,2,4,5-тетракис(4-карбоксифенил)бензол, 4,4',4''-s-триазин-2,4,6-триилтрибензойную кислоту, тримезиновую кислоту, 1,3,5-трис-(4'-карбоксив[1,1'-бифенил]-4-ил)бензол, 1,3,5-трис-(4-карбоксивенил)бензол и 1,3,5-трискарбоксивенилэтинилбензол.

В другом варианте осуществления линкерные соединения, пригодные для использования по настоящему изобретению также включают, но, не ограничиваются этим, линкеры чувствительные к лизосомальным протеазам, с саморасщепляющимся фрагментом на основе анилина или без него. Неограничивающие примеры линкеров, чувствительных к лизосомальным протеазам, представляют собой



которые содержат валин-цитруллиновый дипептидный линкер, разработанный для демонстрации оптимального баланса между плазматической стабильностью и расщеплением под действием внутриклеточных протеаз; см. Tranoy-Opalinski I., Design of self-immolative linkers for tumour-activated prodrug therapy, *Anticancer Agents Med Chem*, 2008 Aug, 8(6):618-637, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

В другом варианте осуществления линкерные соединения пригодные для использования по настоящему изобретению также включают, но, не ограничиваются этим, саморасщепляющиеся линкеры, которые расщепляются под действием β -глюкуронидазы. β -глюкуронидаза присутствует при высокой концентрации в некротической области, окружающей раковые клетки; см. Tranoy-Opalinski I., β -glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: An update, *Eur J Med Chem*, 2014 Mar 3, 74, 302-313, которая в настоящий документ включается в качестве ссылки во всей своей полноте. Неограничивающие примеры саморасщепляемых линкеров, расщепляемых β -глюкуронидазой, представляют собой



и

где X представляет собой NH_2 или NO_2 и где Y представляет собой O или NCH_3 .

Предпочтительные линкерные соединения по настоящему изобретению представляют собой связь или соединение формулы (IV) $\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{Z}$ (IV),

где Y связывается с A;

Z связывается с D;

Y выбирают из группы, состоящей из связи, O, NH, C=O, NHSO_2O и $\text{OC}(=\text{O})\text{O}$; и

Z выбирают из группы, состоящей из O, NH, C=O, $\text{C}(=\text{O})\text{O}$, $\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, SO_2 , $\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2$ и -S-S-; и

n представляет собой целое число от 0 до 6.

Более предпочтительные линкерные соединения по настоящему изобретению представляют собой связь или соединение формулы (IV), где n представляет собой целое число от 0 до 6, Y связывается с A, Z связывается с D, Y выбирают из группы, состоящей из связи и C=O, и Z выбирают из группы, состоящей из NH, C=O, $\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ и $\text{C}(=\text{O})\text{O}$.

Противораковые лекарственные средства, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, паклитаксел, иринотекан, топотекан, гемцитабин, цисплатин, гелданамицин, мертанзин, абиратерон, афатиниб, аминолевулиновую кислоту, апрепитант, акситиниб, азацитидин, белиностаг, бендамустин, бексаротен, блеомицин, бортезомиб, босутиниб, бусульфан, кабазитаксел, кабозантиниб, капецитабин, карбоплатин, карфилзомиб, кармустин, керитиниб, цетуксимаб, хлорамбуцил, клофарабин, кризотиниб, циклофосфамид, цитарабин, дабрафениб, дакарбазин, дактиномицин, дазатиниб, даунорубицин, децитабин, деносуаг, дексразоксан, доцетаксел, доластаины (например, монометилауристин Е), доксорубин, энзалутамид, эпирубицин, эрибулинмесилат, эрлотиниб, этопозид, эверолимус, флоксуридин, флударабинфосфат, флуороурацил, гане-

теспиб, гефинитиб, гемтузумаб озогамидин, гексаметилмеламин, гидроксимочевину, ибритутумаб тиуксетан, ибрутиниб, идеалалисиб, ифосфамид, иматиниб, ипилимумаб, иксабепилон, лапатиниб, лейковорин кальций, ломустин, майтанзиноиды, хлорметин, мелфалан, меркаптопурин, месна, метотрексат, митомицин С, митотан, митоксантрон, неларабин, нелфинавир, нилотиниб, обинутузумаб, офатумумаб, омцетаксин мепесукцинат, оксалиплатин, панитумумаб, пазопаниб, пэгаспаргаза, пембролизумаб, пеметрексед, пентостатин, пертузумаб, пликаницин, помалидомид, понатиниб гидрохлорид, пралатрексад, прокарбазин, радий 223 дихлорид, рамуцирумаб, регорафениб, ретаспимицин, руксолитиниб, семустин, силтуксимаб, сорафениб, стрептозоцин, сунитиниб малат, танеспимицин, темозоломид, темсиролимус, тенипозид, талидомид, тиогуанин, тиотепа, торемифен, траметиниб, трастузумаб, вандетаниб, вемурафениб, винбластин, винкристин, винорелбин, висмодегид, вориностат и зив-афлиберцепт. Любые соединения, которые известны в настоящее время или которые могут действовать в качестве противораковых лекарственных средств, также являются пригодными для использования по настоящему изобретению.

Носители для доставки лекарственных средств PLE по настоящему изобретению могут присоединяться по одному или по несколько к противораковому лекарственному средству на любом количестве возможных стабильных сайтов присоединения через линкерное соединение или непосредственно.

Композиции по настоящему изобретению

В другом аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В одном из предпочтительных аспектов фармацевтическая композиция не содержит Kolliphor® EL (Kolliphor представляет собой зарегистрированное торговое наименование BASF SE). Kolliphor® EL ранее был известен как Cremophor® EL (Cremophor представляет собой зарегистрированное торговое наименование BASF SE).

Реальные уровни доз активных ингредиентов в терапевтических композициях по настоящему изобретению могут быть изменены так, чтобы получить количество активного соединения (соединений), которое является эффективным для достижения желаемой терапевтической реакции для конкретного пациента, композиций и режима введения. Выбранный уровень дозы будет зависеть от активности конкретного соединения, способа введения, тяжести состояния, которое лечится, и от состояния и предыдущей медицинской истории пациента, который лечится. Однако в рамках суждений специалиста в данной области находится начальное дозирование соединения при уровнях ниже, чем те, которые требуются для достижения желаемого терапевтического воздействия, и постепенное увеличение дозы до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое воздействие.

Фраза "терапевтически эффективное количество" соединения по настоящему изобретению означает количество соединения, достаточное для лечения расстройств, при разумном соотношении выгода/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Однако понятно, что общее ежедневное использование соединений и композиций по настоящему изобретению будет определяться наблюдающим врачом в рамках известного медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозирования для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, которое лечат, и тяжесть этого расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, способ введения и скорость выделения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в сочетании или одновременно с конкретным используемым соединением; и тому подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Например, в данной области хорошо известно начальное дозирование соединения при уровнях более низких, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического воздействия, и постепенное увеличение дозировок до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое воздействие.

Общая ежедневная доза соединений по настоящему изобретению, вводимых человеку или низшему животному может находиться в пределах примерно от 0,0001 примерно до 1000 мг/кг/день. Для целей перорального введения более предпочтительные дозы могут находиться в пределах примерно от 0,001 примерно до 5 мг/кг/день. По желанию эффективная ежедневная доза может делиться на множество доз для целей введения; как следствие, отдельные дозированные композиции могут содержать такие количества или их подмножества, которые составляют ежедневную дозу.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, которые содержат соединения по настоящему изобретению, приготовленные вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Фармацевтические композиции могут специально приготавливаться для перорального введения в твердой или жидкой форме, для парентерального введения или для ректального введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться людям и другим млекопитающим перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, трансдермально (например, с использованием пластыря), трансмукозально, сублингвально, пульмонарно, внутривенно, местным образом (например, с помощью порошков, мазей или капель), буккально или в виде перорального или назального спрея. Термины "парентеральный" или "парентерально", как используется

в настоящем документе, относятся к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интратеральную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и вливание.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую компонент по настоящему изобретению и физиологически переносимый разбавитель. Настоящее изобретение включает одно или несколько соединений, как описано выше, приготовленных в виде композиций вместе с одним или несколькими физиологически переносимыми или приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами или носителями, которые коллективно упоминаются в настоящем документе как разбавители, для парентеральной инъекции, для интраназальной доставки, для перорального введения в виде твердой или жидкой формы, для ректального или местного введения, среди прочего.

Композиции, пригодные для парентеральной инъекции могут содержать физиологически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии и стерильные порошки для разбавления в виде стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Примеры пригодных для использования водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или носителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерол, и тому подобное), растительные масла (такие как оливковое масло), сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат, и соответствующие их смеси.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консервирующие, смачивающие, эмульгирующие и распределяющие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может обеспечиваться с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, и тому подобное. Также может быть желательным включение изотонических агентов, например сахаров, хлорида натрия, и тому подобное. Пролонгирование поглощения фармацевтической формы для инъекций может обеспечиваться с помощью использования агентов, замедляющих поглощение, например алюминия моностеарата и желатина.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие, например, как этоксилированные изостеариловые спирты, сложные сорбитоловые и сорбитановые эфиры полиоксиэтилена, микрористаллическую целлюлозу, алюминий метагидроксид, бентонит, агар-агар и смолу трагаканта, или смеси этих веществ, и тому подобное.

Формы депо для инъекций получают посредством формирования микроинкапсулирующих матриц лекарственного средства в биологически деградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения лекарственного средства к полимеру и от природы конкретного используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биологически деградируемых полимеров включают сложные (полиортоэфиры) и поли(ангидриды). Препараты депо для инъекций приготавливают также посредством захвата лекарственного средства в липосомах или микроэмульсиях, которые совместимы с тканями организма.

Препараты для инъекций можно стерилизовать, например, посредством фильтрации через фильтр, удерживающий бактерии, или посредством введения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или в другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед использованием.

Твердые дозированные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых дозированных формах активное соединение можно смешивать по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, такими как цитрат натрия или дикальций фосфат и/или а) с наполнителями или веществами для увеличения объема, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннитол и кремниевая кислота; б) со связующими веществами, такими как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и смола акации; в) с увлажнителями, такими как глицерол; г) с разрыхляющими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия; д) с веществами, замедляющими растворение, такими как парафин; е) с ускорителями поглощения, такими как соединения четвертичного аммония; г) со смачивающими агентами, такими как цетиловый спирт и глицерол моностеарат; з) с поглотителями, такими как каолин и бентонитная глина, и и) со смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрий лаурилсульфат и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль, дозированная форма может также содержать буферные агенты.

Твердые композиции сходного типа могут также использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей, и тому подобное.

Твердые дозированные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут приготавливаться с покрытиями и оболочками, такие как энтеральные покрытия и другие покрытия хорошо известные в области фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать замутняющие агенты и могут также иметь такую композицию, что они высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только или преимущественно в определенной части кишечника, необязательно, замедленным образом. Примеры композиций для введения лекарственных средств, которые можно использовать, включают полимерные

вещества и воски.

Активные соединения могут также иметь микроинкапсулированную форму, если это необходимо, с одним или несколькими из рассмотренных выше эксципиентов.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие, например, как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло из проростков семян пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерол, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные сорбитановые эфиры жирных кислот и их смеси.

Кроме инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подслащающие, ароматизирующие и парфюмерные агенты.

Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые можно приготавливать посредством смешивания соединений по настоящему изобретению с соответствующими нераздражающими эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при температуре тела, и по этой причине они плавятся в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активное соединение.

Соединения по настоящему изобретению могут также вводиться в форме липосом. Как известно в данной области, липосомы, как правило, получают из фосфолипидов или других липидных веществ. Липосомы образуются в виде моно- или мультисамеллярных гидратированных жидких кристаллов, которые диспергируются в водной среде. Можно использовать любой физиологически приемлемый и метаболизируемый липид, который может образовывать липосомы. Композиции по настоящему изобретению в форме липосом могут содержать, в дополнение к соединению по настоящему изобретению, стабилизаторы, консерванты, эксципиенты, и тому подобное. Предпочтительные липиды представляют собой природные и синтетические фосфолипиды и фосфатидилхолины (лецитины), используемые по отдельности или вместе. Способы формирования липосом известны в данной области; см., например, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo*.

В одном из способов по настоящему изобретению фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. Например, агент может вводиться с использованием внутривенного вливания, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других режимов введения. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. Еще в одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может располагаться вблизи терапевтической мишени, например печени, таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

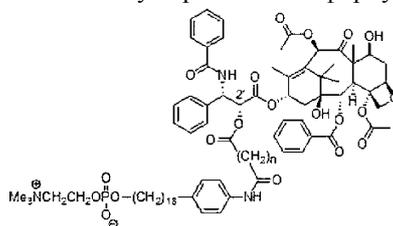
В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ лечения заболевания или состояния у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по настоящему изобретению.

Как правило, настоящее изобретение не ограничивается лечением какого-либо конкретного заболевания или состояния, но охватывает лечение любого заболевания или состояния, на механизм которого могут влиять соединения по настоящему изобретению.

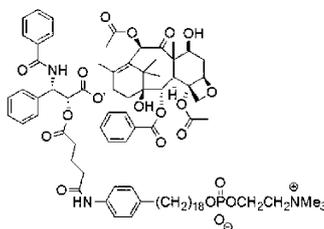
Репрезентативные варианты осуществления

Конъюгаты паклитаксел-CLR1404.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через сложноэфирную связь на группе 2'-ОН

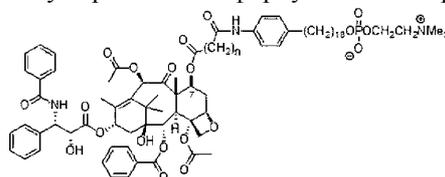


В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера полуамида глутаровой кислоты, где линкер полуамида глутаровой кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через сложный эфир, связанный на группе 2'-ОН

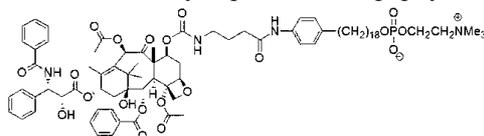


конъюгат CLR1601.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через сложноэфирную связь на группе 7-ОН

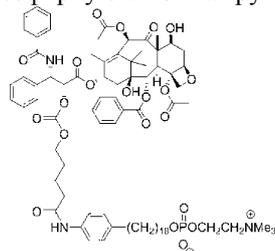


В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера карбаминной кислоты, где линкер карбаминной кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через сложноэфирную связь на группе 7-ОН



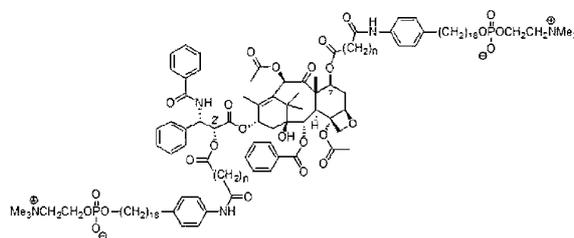
конъюгат CLR1602.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера угольной кислоты, где линкер угольная кислота присоединена к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через сложноэфирную связь на группе 7-ОН

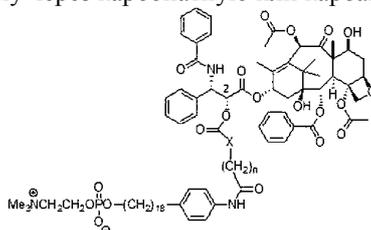


конъюгат CLR1603.

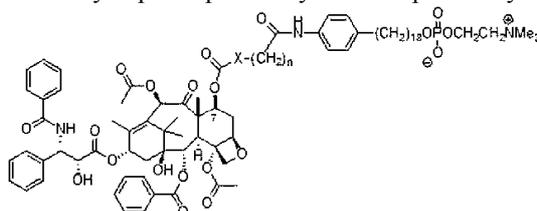
В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с двумя сердцевинными соединениями CLR1404 с помощью линкеров дикарбоновых кислот, где линкеры дикарбоновых кислот присоединены к сердцевинным соединениям CLR1404 через амидные связи и к паклитакселу через сложноэфирные связи, как на группе 2'-ОН, так и на группе 7-ОН



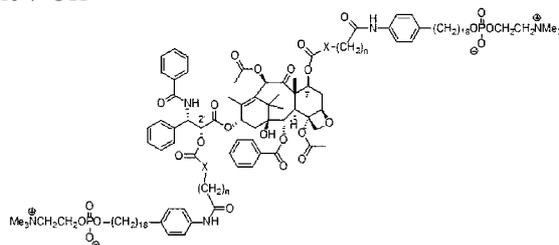
В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через карбонатную или карбаматную связь на группе 2'-ОН



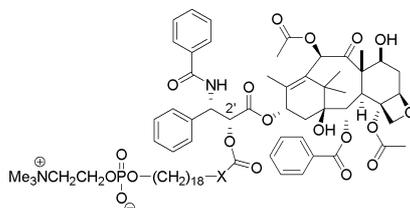
В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединена к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к паклитакселу через карбонатную или карбаматную связь на группе 7-ОН



В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с двумя сердцевинными соединениями CLR1404 с помощью линкеров дикарбоновых кислот, где линкеры дикарбоновых кислот присоединены к двум сердцевинным молекулам CLR1404 через амидные связи и к паклитакселу через карбонатную или карбаматную связь, как на группе 2'-ОН, так и на группе 7-ОН

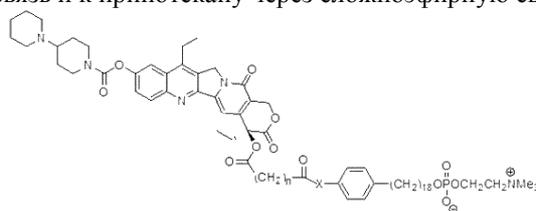


В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой паклитаксел, связанный с соединением C18 алкилфосфохолином через линкер карбоновой кислоты, где линкер карбоновой кислоты присоединен к соединению C18 алкилфосфохолину через амидную или карбонатную связь и к паклитакселу через карбонатную или карбаматную связь на группе 2'-ОН



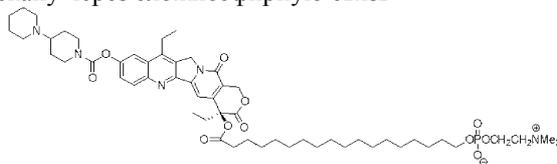
Конъюгат иринотекан-CLR1404.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой иринотекан, связанный с соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через карбонатную или карбаматную связь и к иринотекану через сложноэфирную связь



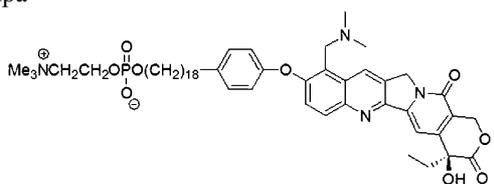
Конъюгат иринотекан-C18 алкилфосфохолин.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой иринотекан, связанный с соединением C18 алкилфосфохолином с помощью карбонильного линкера, где карбонильный линкер присоединен к соединению C18 алкилфосфохолину через связь углерод-углерод и к иринотекану через сложноэфирную связь

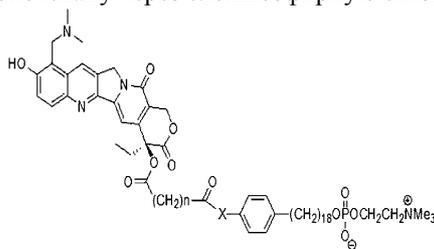


Конъюгаты топотекан-CLR1404.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой топотекан, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью негидролизуемого простого фенилового эфира

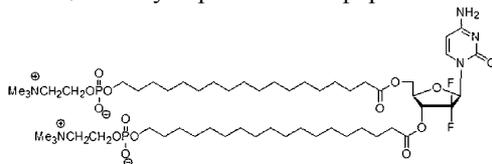


В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой топотекан, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера дикарбоновой кислоты, где линкер дикарбоновой кислоты присоединен к соединению CLR1404 через карбонатную или карбаматную связь и к топотекану через сложноэфирную связь

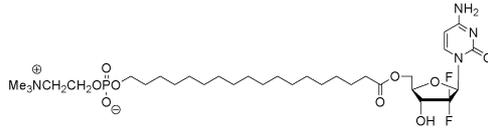


Конъюгат гемцитабин-C18 алкилфосфохолин.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой гемцитабин, связанный с двумя соединениями C18 алкилфосфохолинов с помощью карбонильных линкеров, где карбонильные линкеры присоединены к соединениям C18 алкилфосфохолином через связи углерод-углерод и к гемцитабину через сложноэфирные связи

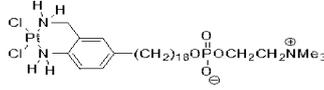


В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой гемцитабин, связанный с соединением C18 алкилфосфохолином с помощью карбонильного линкера, где карбонильный линкер присоединен к соединению C18 алкилфосфохолину через связь углерод-углерод и к гемцитабину через сложноэфирную связь



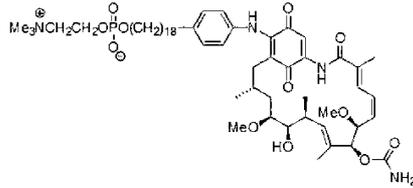
Конъюгат цисплатин-сердцевинное соединение CLR1404.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой цисплатин, присоединенный непосредственно к сердцевинному соединению CLR1404

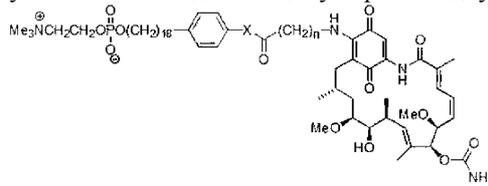


Конъюгаты гелданамицин-CLR1404.

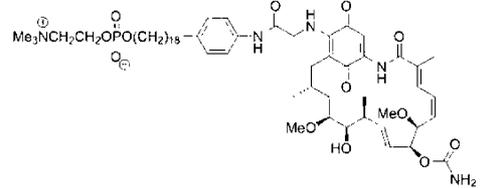
В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой гелданамицин, присоединенный непосредственно к сердцевинному соединению CLR1404



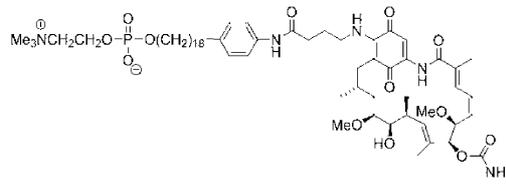
В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой гелданамицин, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью короткого линкера аминокислоты, где линкер аминокислоты присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через карбонатную или карбаматную связь и к гелданамицину через амидную связь



В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой гелданамицин, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера аминобутирамида, где линкер аминобутирамида присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через карбаматную связь и к гелданамицину через амидную связь



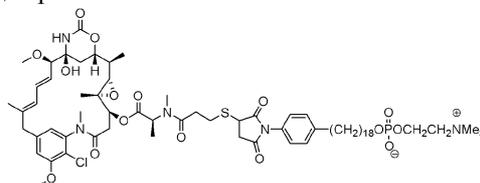
конъюгат CLR1606 и



конъюгат CLR1607.

Конъюгаты мертанзин-CLR1404.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое соединение представляет собой мертанзин, связанный с сердцевинным соединением CLR1404 с помощью линкера малеимида, где линкер малеимида присоединен к сердцевинному соединению CLR1404 через амидную связь и к мертанзину через связь углерод-сера

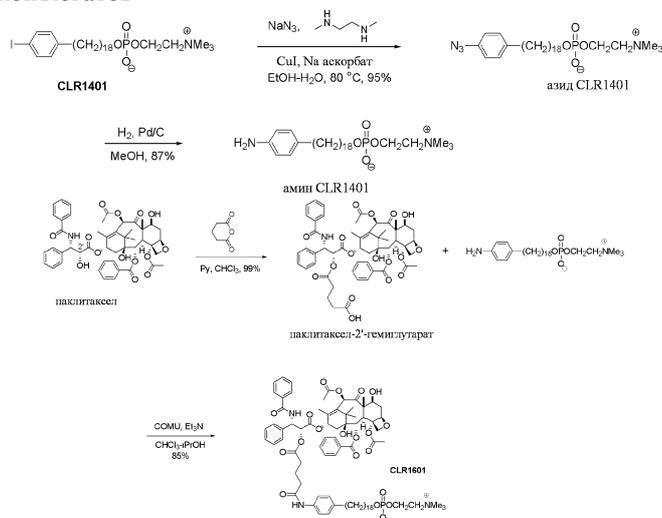


конъюгат CLR1608.

Для всех репрезентативных вариантов осуществления п представляет собой целое число от 2 до 6 и X представляет собой O или NH.

Примеры

Пример 1. Синтез конъюгатов



I. Синтез CLR1601.

A. Синтез азид CLR1401.

18-(п-Йодфенил)октадецилфосфохолин (4,01 г, 6,3 ммоль), азид натрия (818 мг, 12,6 ммоль) и аскорбат натрия (140 мг, 0,71 ммоль) растворяют в смеси дегазированного этанола (28 мл) и воды (12 мл) в реакционной емкости. К реакционной смеси добавляют йодид меди(I) (120 мг, 0,63 ммоль) и N,N'-диметилендиамин (0,1 мл, 0,94 ммоль). Реакционную емкость плотно закрывают, и смесь перемешивают при 80°C в течение 45 мин. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют воду (60 мл), и смесь перемешивают в течение 30 мин на открытом воздухе. Смесь переносят в делительную воронку, добавляют хлороформ (80 мл) и метанол (52 мл), и осуществляют экстрагирование посредством встряхивания. Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×80 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе промывают с помощью 0,01н. HCl, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают досуха. Остаток растворяют в хлороформе (4 мл), и медленно добавляют ацетон (170 мл) при перемешивании. Смесь перемешивают в течение 30 мин и фильтруют. Продукт промывают на фильтре ацетоном и сушат в высоком вакууме с получением 3,31 г (95%) 18-(п-азидофенил)октадецилфосфохолина.

B. Синтез амина CLR1401.

18-(п-Азидофенил)октадецилфосфохолин (3,116 г) помещают в аппарат Парра высокого давления, добавляют метанол (30 мл) и катализатор 10% Pd/C (100 мг). Реакцию гидрирования осуществляют под давлением водорода (55 фунт/кв.дюйм (3,4 кг/кв.см)) при встряхивании в течение 24 ч. Давление в емкости понижают, добавляют хлороформ и метанол для растворения некоторого количества выпавшего продукта реакции, и смесь фильтруют для удаления катализатора. Фильтрат выпаривают досуха, и остаток растворяют в теплой смеси хлороформ-метанол (1:1) (10 мл). Медленно добавляют горячий ацетон (150 мл) при перемешивании, смесь охлаждают до температуры окружающей среды при перемешивании и фильтруют. Продукт промывают на фильтре ацетоном и сушат в высоком вакууме. Выход 18-(п-аминофенил)октадецилфосфохолина: 2,597 г (87%).

C. Синтез паклитаксел-2'-гемиглутарата.

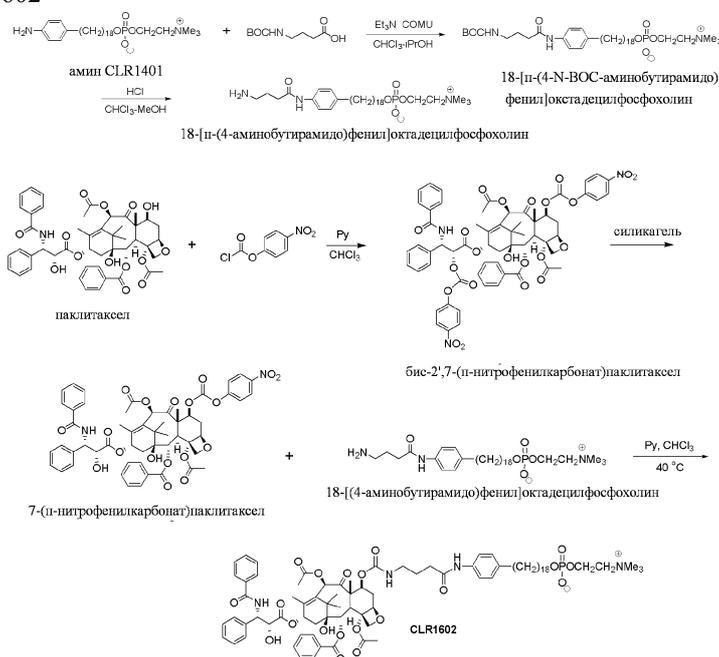
Паклитаксел (404 мг, 0,437 ммоль) и глутаровый ангидрид (67 мг, 0,588 ммоль) растворяют в хлороформе (8 мл), и добавляют пиридин (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч и выпаривают досуха. Остаток выдерживают в высоком вакууме в течение 1,5 ч для удаления оставшегося пиридина. Сырой продукт очищают с помощью хроматографии на силикагеле в смеси хлороформ-метанол (градиент от 98:2 до 95:5) с получением 452 мг (99%) паклитаксел-2'-гемиглутарата.

D. Синтез CLR1601.

Паклитаксел-2'-гемиглутарат (947 мг, 0,978 ммоль) и 18-(п-аминофенил)октадецилфосфохолин (492 мг, 0,934 ммоль) суспендируют в смеси хлороформа (40 мл) и изопропанола (1,2 мл). К этой суспензии добавляют триметиламин (0,27 мл, 1,957 ммоль) и COMU (419 мг, 0,978 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч, за это время она становится прозрачной и однородной. Реакционную смесь переносят в делительную воронку и смешивают с хлороформом (40 мл), метанолом (80 мл) и холодной водой (72 мл). Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×80 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпари-

вают досуха. Оставшийся остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:4). После выпаривания растворителя, продукт сушат в высоком вакууме с получением 1,167 г (85%) CLR1601.

II. Синтез CLR1602



А. Синтез 18-[п-(4-N-BOC-аминобутиридо)фенил]октадецилфосфохолина.

18-(п-Аминофенил)октадецилфосфохолин (76 мг, 0,144 ммоль) и 4-N-BOC-аминомасляную кислоту (38 мг, 0,188 ммоль) суспендируют в хлороформе (5 мл) и изопропанол (0,15 мл), затем добавляют триэтиламин (0,05 мл, 0,38 ммоль), затем COMU (80 мг, 0,188 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч и гасят с помощью 2 мл насыщенного водного раствора NaHCO_3 . Погашенную реакционную смесь переносят в разделительную воронку и смешивают с хлороформом (35 мл), метанолом (40 мл) и холодной водой (36 мл). Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×40 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и выпаривают досуха. Остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:4). После выпаривания растворителя продукт растворяют в теплой смеси хлороформ-метанол (1,5 мл) и преципитируют с помощью ацетона. Продукт собирают посредством фильтрования и сушки в высоком вакууме с получением белого порошка (100 мг, 97%).

В. Синтез 18-[п-(4-аминобутиридо)фенил]октадецилфосфохолина.

18-[4-N-BOC-аминобутиридо)фенил]октадецилфосфохолин (98 мг, 0,138 ммоль) растворяют в смеси хлороформа (4 мл), метанола (2 мл) и концентрированной HCl (0,2 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре окружающей среды, а затем гасят посредством медленного добавления насыщенного водного раствора NaHCO_3 (3 мл). Погашенную реакционную смесь переносят в разделительную воронку и смешивают с хлороформом (40 мл), метанолом (40 мл) и холодной водой (36 мл). Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×40 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и выпаривают досуха. Продукт очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (100:65) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-концентрированного NH_4OH (водного раствора) (100:65:15). После выпаривания растворителя продукт сушат в высоком вакууме с получением 50 мг (60%) 18-[п-(4-аминобутиридо)фенил]октадецилфосфохолина.

С. Синтез 7-(п-нитрофенилкарбоната)паклитаксела.

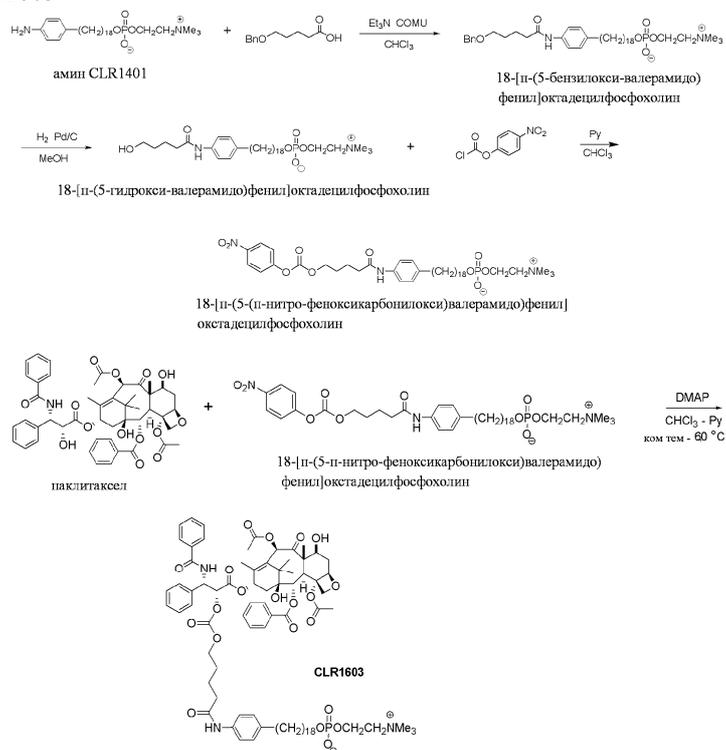
Паклитаксел (100 мг, 0,117 ммоль) растворяют в хлороформе (4,5 мл), добавляют 8 капель пиридина, и раствор охлаждают на ледяной бане. Добавляют одной порцией твердый п-нитрофенилхлорформиат (200 мг, 1 ммоль). Реакционной смеси позволяют нагреться до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 24 ч, затем гасят водой (1 мл) и перемешивают в течение 15 мин. Смесь экстрагируют хлороформом, экстракт промывают водой, сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и выпаривают досуха. Сырой бис-2',7-(п-нитрофенилкарбонат)паклитаксел растворяют в хлороформе и загружают в колонку с силикагелем. Сырой продукт оставляют в колонке на 72 ч для завершения гидролиза п-нитрофенилкарбоната в 2'-положении. Колонку элюируют дихлорметаном-этилацетатом (градиент от 98:2 до 90:10). После выпаривания растворителя продукт преципитируют с помощью гексана и

сушат в высоком вакууме с получением 63 мг (53%) 7-(п-нитрофенилкарбоната)паклитаксела; см. Agrisico S., et al., Int J Pharm, 2013, 454, 653-659.

D. Синтез CLR1602.

7-(п-Нитрофенилкарбонат)паклитаксел (53 мг, 0,052 ммоль) и 18-[п-(4-аминобутирамидо)фенил]октадецилфосфохолин (47 мг, 0,077 ммоль) суспендируют в хлороформе (2 мл) и пиридине (0,5 мл) и перемешивают при 40°C в течение 5 ч. Реакционную смесь выпаривают досуха, и остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:4). После выпаривания растворителя соединение сушат в высоком вакууме с получением 67 мг (86%) твердого CLR1602.

III. Синтез CLR1603



A. Синтез 18-[п-(5-бензилоксивалерамидо)фенил]октадецилфосфохолина.

18-(п-Аминофенил)октадецилфосфохолин (760 мг, 1,443 ммоль) и 5-бензилоксивалериановую кислоту (361 мг, 1,732 ммоль; синтезированные в соответствии с Can J Chem, 1992, 70, 1472-1445 и Org Lett, 2014, 16, 516-519), суспендируют в хлороформе (25 мл) и добавляют триэтиламин (0,3 мл, 2,164 ммоль), затем твердый COMU (741 мг, 1,732 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч и после завершения перемешивания, ее переносят в разделительную воронку и смешивают с хлороформом (55 мл), метанолом (80 мл) и холодной водой (72 мл). Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×80 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают досуха. Остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:3). После выпаривания растворителя и сушки в высоком вакууме, продукт растворяют в теплой смеси хлороформ-метанол (3 мл), и медленно добавляют горячий ацетон (75 мл) при перемешивании. Смесь охлаждают до температуры окружающей среды при перемешивании и фильтруют. Собранный продукт сушат в высоком вакууме с получением 18-[п-(5-бензилокси-валерамидо)фенил]октадецилфосфохолина (887 мг, 86%) в виде белого порошка.

B. Синтез 18-[п-(гидроксивалерамидо)фенил]октадецилфосфохолина.

18-[п-(5-Бензилоксивалерамидо)фенил]октадецилфосфохолин (868 г) растворяют в метаноле (15 мл), переносят в аппарат Парра высокого давления, и добавляют катализатор 10% Pd/C (75 мг). Реакцию гидрирования осуществляют под давлением водорода (55 фунт/кв.дюйм (3,4 кг/кв.см)) при встряхивании в течение 24 ч. Давление в емкости понижают, и смесь фильтруют для удаления катализатора. Фильтрат выпаривают досуха, и остаток растворяют в теплой смеси хлороформ-метанол (3-4 мл). Медленно добавляют горячий ацетон (75 мл) при перемешивании. Смесь охлаждают до температуры окружающей среды при перемешивании и фильтруют. Собранный продукт сушат в высоком вакууме с получением 18-[п-(5-гидрокси-валерамидо)фенил]октадецилфосфохолина (718 мг, 95%) в виде белого порошка.

C. Синтез 18-[п-(5-(п-нитрофеноксикарбонилокси)валерамидо)фенил]октадецилфосфохолина.

18-[п-(5-Гидроксивалерамидо)фенил]октадецилфосфохолин (40 мг, 0,064 ммоль) и п-нитрофенилхлорформиат (25 мг, 0,124 ммоль) суспендируют в хлороформе (3 мл), и добавляют пиридин

(0,2 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре.

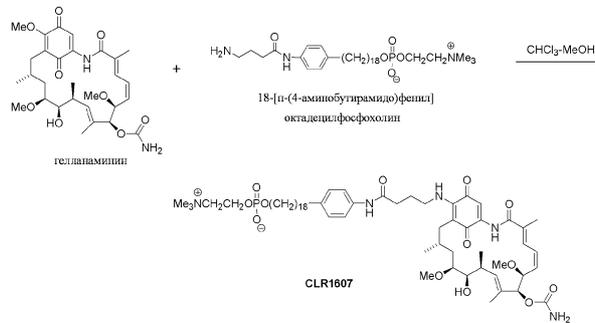
Добавляют дополнительную порцию п-нитрофенилхлорформиата (15 мг), и перемешивание продолжают в течение еще 1,5 ч. Реакция завершается согласно анализу с помощью TLC. Реакционную смесь гасят с помощью 1 мл 1н. HCl и переносят в разделительную воронку с хлороформом (20 мл), метанолом (20 мл) и холодной водой (15 мл). Экстрагирование повторяют (3×20 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают досуха. Остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:4). После выпаривания растворителя и преципитации с помощью ацетона, остаток сушат в высоком вакууме с получением 4,8 мг (95%) твердого материала.

D. Синтез CLR1603.

Паклитаксел (46 мг, 0,054 ммоль) и 18-[п-(5-(п-нитро-феноксикарбонилокси)валерамидо)фенил]октадецилфосфохолин (43 мг, 0,054 ммоль) суспендируют в хлороформе (2 мл) и пиридине (0,5 мл) в реакционной пробирке. Добавляют DMAP (8 мг, 0,065 ммоль), пробирку плотно закрывают, и содержимое перемешивают при 60°C в течение 48 ч. Добавляют дополнительное количество паклитаксела (20 мг), и реакцию продолжают при 60°C в течение еще 48 ч. Реакционную смесь концентрируют, и остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:2) и (65:25:4).

Выпаривание растворителя и сушка в высоком вакууме дают CLR1603 (50 мг, 62%).

IV. Синтез CLR1607

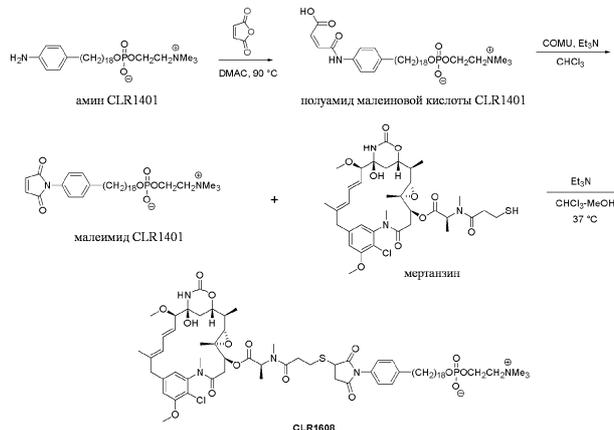


Гелданамицин (111 мг, 0,198 ммоль) и 18-[п-(4-аминобутирамидо)фенил]октадецилфосфохолин (110 мг, 0,18 ммоль) растворяют в хлороформе (3,5 мл) и метаноле (1 мл). Добавляют одну каплю триэтиламина, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч. TLC (тонкослойная хроматография) показывает завершение реакции примерно на 80%. Добавляют дополнительный гелданамицин (10 мг), и перемешивание продолжают в течение еще 24 ч. Реакционную смесь концентрируют, и остаток очищают с помощью хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:2), (65:25:3) и (65:25:4). После выпаривания растворителя и сушки в высоком вакууме добавляют ацетон и смесь выпаривают. CLR1607 получают в виде пурпурного твердого продукта (174 мг, 85%).

Идентичность каждого выделенного продукта подтверждается с помощью ¹H-ЯМР и масс-спектрометрического анализа.

Примеры 2-8 демонстрируют способность CLR1404 и родственных молекул к секвестрированию и удерживанию различными типами раковых клеток, при этом они отсутствуют в здоровых тканях.

V. Синтез CLR1608



А. Синтез полуамида малеиновой кислоты CLR1401.

Амин CLR1401 (300 мг, 0,57 ммоль) растворяют в N,N-диметилацетамиде (12 мл) при 90°C, и добавляют одной порцией малеиновый ангидрид (61 мг, 0,627 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры и перемешивают в течение 24 ч. Медленно добавляют ацетон (25 мл) при перемешивании, и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Выпавший продукт отфильтровывают и промывают на фильтре ацетоном, затем сушат в высоком вакууме. Выход: 32,7 мг (92%).

В. Синтез малеимида CLR1401.

Полуамид малеиновой кислоты CLR1401 (100 мг, 0,16 ммоль) суспендируют в хлороформе, не содержащем этанола (5 мл), затем добавляют триэтиламин (0,05 мл, 0,352 ммоль) и COMU (75 мг, 0,176 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 24 ч, затем переносят в разделительную воронку и смешивают с хлороформом (40 мл), метанолом (40 мл) и холодной водой (36 мл). Слой хлороформа удаляют, и экстрагирование повторяют (2×40 мл хлороформа). Объединенные экстракты в хлороформе сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают досуха. Оставшийся остаток очищают посредством хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:4). После выпаривания растворителя продукт преципитируют с помощью ацетона, собирают и сушат в высоком вакууме с получением 87 мг (90%) малеимида CLR1401.

С. Синтез CLR1608.

Малеимид CLR1401 (40 мг, 0,066 ммоль) и мертанзин (53 мг, 0,072 ммоль) растворяют в смеси хлороформа (1,7 мл) и метанола (0,3 мл). Добавляют триэтиламин (0,08 мл), и смесь перемешивают при 37°C в течение 24 ч. Реакционную смесь концентрируют, и остаток очищают посредством хроматографии на силикагеле с помощью хлороформа-метанола (градиент от 9:1 до 5:5) с последующим конечным элюированием с помощью хлороформа-метанола-воды (65:25:3). После выпаривания растворителя, продукт сушат в высоком вакууме с получением 62 мг (70%) CLR1608.

Пример 2. CLR1501 преимущественно секвестрируется раковыми клетками с помощью липидных рафтов.

Материалы и методы.

Клетки PC-3 предварительно обрабатывают либо 2 мкг/мл Filipin III, либо носителем в течение 15 мин, затем промывают и инкубируют вместе с 2 мкКюри ¹²⁵I-CLR1404 в течение 1 ч. Среду удаляют, и клетки промывают фосфатно-буферным солевым раствором, содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина, трипсинизируют, затем разделяют их на два образца для определения количества клеток с помощью содержания ДНК (A₂₈₀ по сравнению с конкретной стандартной кривой для линии клеток) и отсчетов в минуту с использованием гамма-счетчика Gamma Counter (Perkin Elmer).

Результаты.

Предварительная обработка клеток PC-3 Filipin III, агентом, который секвестрирует холестерин и разрушает липидные рафты, дает примерно 40% уменьшение потребления ¹²⁵I-CLR1404 по сравнению с необработанными контрольными клетками (фиг. 1). Это поддерживает ту гипотезу, что CLR1404 использует липидные рафты в качестве порталов для входа в раковые клетки. При этом более высокие концентрации Filipin III являются цитотоксичными, и, следовательно, нельзя продемонстрировать полного исчезновения липидных рафтов (и предположительно, полного ингибирования потребления аналога CLR1404).

Пример 3. Предпочтительное потребление CLR-1501 раковыми клетками по сравнению со здоровыми клетками.

Материалы и методы.

Линии раковых клеток человека покупают у American Type Culture Collection (ATCC). Они включают следующее: Sak1-2 (рак почек; светлоклеточный рак), HCT-116 (карцинома толстой и прямой кишки); MES-SA/Dx5 (саркома матки) [все они поддерживаются в среде McCoy's 5a, дополненной 10% фетальной сывороткой телят (FBS)], Ovar-3 (аденокарцинома яичников) [поддерживается в среде RPMI, дополненной 20% FBS], U87-MG (глиома) [поддерживается в минимальной поддерживающей среде, дополненной 10% FBS], Mia Pasa-2 (карцинома поджелудочной железы) (поддерживается в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко, дополненной 10% FBS), PC-3 (рак предстательной железы) (поддерживается в среде F-12K, дополненной 10% FBS), MDA-MB-231 (трижды отрицательная аденокарцинома молочной железы) (поддерживается в среде Лейбовица, дополненной 10% FBS) и A549 (не-мелкоклеточная карцинома легких) (поддерживается в среде F-12, дополненной 10% FBS). Нормальные фибробласты кожи человека покупают у ATCC и выращивают в Fibroblast Basal Medium PCS-201-030, дополненной набором, не содержащим сыворотки (Fibroblast Growth Kit-Serum-Free PCS-201-040). Все среды (за исключением линии клеток MDA-MB-231) также содержат пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) и поддерживаются при 37°C с 5% CO₂ в воздухе.

Все клетки хранят при 37°C в соответствующей среде, дополненной 10% FBS и 5% CO₂. Перед получением изображений клетки удаляют из колб с 0,25% трипсина, и они получают возможность для роста в течение ночи на микрослайдах VI (Ibidi). На следующий день клетки промывают фосфатно-

буферным солевым раствором (PBS) и инкубируют вместе либо с 5, либо с 7,5 мкМ (как показано) CLR1501 в соответствующей среде, не содержащей сыворотки, в течение 24 ч. CLR1501 представляет собой флуоресцентно меченый аналог CLR1404. CLR1501 приготавливают с помощью 0,4% Polysorbate 20, 2% этанола и буферного солевого раствора. После тщательной промывки PBS, получают изображения клеток с использованием лазерного сканирующего/многофотонного конфокального микроскопа Radiance 2100 MP Rainbow, Bio-Rad, с использованием времени экспонирования 1 с. Альтернативно, клетки визуализируют с использованием конфокального микроскопа Nikon AIR (Keck Laboratory, University of Wisconsin-Madison). Сигнал испускания от CLR1501 детектируют с использованием фильтров Alexa Fluor 488 (возбуждение/испускание 480/520 нм).

Результаты.

CLR1501 вводят пяти различным линиям раковых клеток (рак почек, яичников, поджелудочной железы, меланома и рак предстательной железы) и линии нормальных фибробластов кожи человека *in vitro*. Через 24 ч CLR1501 демонстрируют пяти-, девятикратное преимущественное потребление в этих линиях раковых клеток *in vitro* по сравнению с нормальными фибробластами (фиг. 2). Удерживаемый CLR1501 ассоциируется с плазматическими мембранами и мембранами органелл.

Пример 4. Модель глиомы крыс.

Материалы и методы.

Все животные содержатся в соответствии с University of Wisconsin Research Animal Resources Center guidelines, и с ними обращаются соответственно. Клетки глиомы C6 крысы размножаются в среде DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD), дополненной 10% термически дезактивированного FBS (BioWhittaker, Walkersville, MD), 100 Ед./мл пенициллина G, 100 мг/мл стрептомицина и 0,01 М HEPES (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Имплантацию внутрочерепной опухоли осуществляют, как описано ранее. Cohen JD, et al., Intracranial C6 glioma model in adult Wistar-Furth rats. *J Neuro Oncol* 1990 8(1):95-6. Вкратце, 1×10^6 клеток C6 повторно суспендируют в 5 мл 1,2% метилцеллюлозы и вводят в передние доли головного мозга анестезированных самок крыс Wistar (Harlan, Indianapolis, IN). Ложно оперированные животные принимают внутрочерепные инъекции такого же объема метилцеллюлозы без клеток опухоли.

Исследования с получением изображений.

Через десять дней после имплантации присутствие внутрочерепных опухолей подтверждается с помощью MRI. Вкратце, анестезированные крысы (6) получают 2 мл гадолиаида (Gd, Omniscan 287 мг/мл, Nycomed, Princeton, NJ) внутривенно, и для них, изображения получают через 10 мин с использованием клинической системы MR (GE Signa LX), 1,5 Тесла, и оконечной катушки с фазированной решеткой GE. T1-взвешенные (TR=500 мс TE=16,5 мс) многосрезовые последовательности, перекрывающие весь головной мозг каждой крысы, рассматриваются с целью выбора крыс с опухолями, с различными размерами опухолей, и ложно оперированных крыс, для инъекций NM404.

NM404 [18-(4-йодфенил)октадецилфосфохолин] (100 мг) радиационно йодируют с помощью ^{125}I посредством изотопного обмена с Na^{125}I в расплаве пивалиновой кислоты. Weichert, et al. *Int J Appl Rad Isotopes*. 1986; 37:907-913. NM404 имеет такую же химическую структуру, как и CLR1404, за исключением того, что он радиационно йодируется ^{125}I вместо ^{124}I или ^{131}I . После очистки с помощью ВЭЖХ NM404 растворяют в водном 2% растворе Polysorbate 20 перед введением в хвостовую вену (5-20 мкКюри/200 г крыс) четырем имеющим опухоли и трем ложно оперированным крысам. В дни 1 (n=1), 2 (n=1) и 4 (n=2) после инъекции NM404 животных подвергают эвтаназии (CO_2), и их головной мозг иссекают, и получают его изображения на модифицированном радио-TLC сканере Bioscan AR2000 (1-мм шаги при 2 мин экспозиции/полоса и 1-мм коллиматор высокого разрешения). В дополнение к этому, нормальный головной мозг, кровь, почки, печень, селезенку, щитовидную железу и ткани опухоли взвешивают, и измеряют радиоактивность на гамма-счетчике. Распределение радиоактивности в тканях коррелируют затем с гистологией головного мозга.

Результаты и обсуждение.

Начальные результаты получения изображений с помощью NM404 показывают сильное потребление и пролонгированное удерживание во всех глиомах, находящихся в пределах диаметров 3-5 мм. Радиоактивность в нормальных тканях головного мозга является минимальной у ложно оперированных контрольных животных (фиг. 4А и 4В), в то время как NM404 интенсивно концентрируется в глиомах (фиг. 4А'-Д'). Отношения опухолей к головному мозгу (% дозы, введенной с помощью инъекции/г) у крыс с C6 глиомой составляют 10,5, 12,2 и 6,7 через 24, 48 и 96 ч соответственно. Как наблюдается на предыдущей культуре клеток и при исследованиях *in vivo* на животных моделях, NM404 явно метаболизируется и удаляется из нормальных клеток, но метаболически захватывается в мембранах опухолевых клеток. Предыдущие эксперименты по ауторадиографии на других моделях опухолей показывают, что только жизнеспособные клетки опухолей, но не нормальные ткани или некротические ткани, способны аккумулировать NM404. Что интересно, даже малые опухоли, насчитывающие несколько мм в диаметре, также детектируются после введения NM404. Эти предварительные данные говорят, что CLR1404 также может быть полезным для визуализации малых очагов инвазивных опухолей.

Выводы.

Как и в случае всех моделей опухолей, изучаемых ранее, NM404 демонстрирует селективное и про-

лонгированное удерживание С6 глиомами крыс, оцениваемыми в настоящем исследовании.

Пример 5. Потребление ^{124}I -CLR1404 в различных злокачественных опухолях.

Материалы и методы.

Все описанные исследования на животных осуществляют в соответствии с протоколами для животных, одобренными Institutional Animal Care and Use Committee. Самок атимических голых мышей (Hsd:ATHYMIC Nude-Foxn1nu или CrI:NU-Foxn1nu, Charles River Laboratories) в возрасте примерно от 4 до 5 недель, 16-18 г (n=6) используют для исследования ксенотрансплантатов опухолей человека. Мышей анестезируют изофлураном, и делают им подкожную инъекцию жизнеспособных клеток опухоли в 100 мкл PBS Дюльбекко (или, для клеток глиомы, в 50 мл PBS) в правый бок. Размеры инокула составляют 1×10^6 (для моделей рака почек, яичников, глиомы, рака поджелудочной железы, предстательной железы и NSCLC), 2×10^6 (для моделей рака толстой и прямой кишки и рака матки) или 3×10^6 (для рака молочной железы).

Результаты.

Радиационно йодированный ^{124}I -CLR1404 исследуют в подкожных и ортотопических ксенотрансплантатах 60 различных спонтанных, трансгенных линиях злокачественных клеток и типах опухолей и в линиях злокачественных клеток и типах опухолей человека и грызунов. После внутривенного введения, ^{124}I -CLR1404 локализуется почти во всех первичных и метастатических злокачественных опухолях, независимо от анатомического положения. Репрезентативные примеры представлены как для опухолей человека (фиг. 5A-5I), так и для опухолей грызунов (фиг. 5J-5M).

Таблица 1
Потребление ^{124}I -CLR1404 в широком спектре типов раковых заболеваний

	Модель опухоли	Виды	Категория	Потребление*
1	PC-3 предстательной железы	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
2	A-549 легких (NSCLC)	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
3	NCI H-69 легких (овсяновидные клетки)	Мышь SCID	Мелкоклеточная карцинома	да
4	H-295 почек	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
5	RL-251 почек	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
6	Рак толстой кишки- 51	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
7	Рак толстой кишки LS180	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
8	Рак толстой кишки DLD1	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
9	Рак толстой кишки HT-29	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
10	Рак толстой кишки	Голые мыши	Аденокарцинома	да

	LS-180			
11	Глиобластома U87	Голые мыши и NOD-SCID	Глиома	да
12	Меланома A-375	Голые мыши	Аденокарцинома	да
13	Множественная миелома MM.1S	Голые мыши	Миелома	да
14	Нейробластома SK-N-AS	Голые мыши	Нейробластома	да
15	Нейробластома NB1691	Голые мыши	Нейробластома	да
16	Нейробластома CHLA-20	Голые мыши	Нейробластома	да
17	Нейробластома Lan5	Голые мыши	Нейробластома	да
18	Рак яичников H77	Голые мыши	Аденокарцинома	да
19	Рак яичников Ovcар-3	Голые мыши	Аденокарцинома	да
20	Рак поджелудочной железы ВХРС3	Голые мыши	Аденокарцинома	да
21	Рак поджелудочной железы Mia Paca-2	Голые мыши	Карцинома	да
22	Рак поджелудочной железы Саран-1	Голые мыши	Аденокарцинома	да
23	Почечноклеточный рак Sak1-2	Голые мыши (ортоотопический)	Светлоклеточная карцинома	да
24	Почечноклеточный рак ACHN	Голые мыши (ортоотопический)	Аденокарцинома	да
25	Саркома (Meth-A)	Голые мыши	Фибросаркома	да
26	Рак головы и шеи SCC1	Голые мыши	Карцинома сквамозных клеток	да
27	Рак головы и шеи SCC6	Голые мыши	Карцинома сквамозных клеток	да
28	Рак предстательной железы LNCар	Мыши	Аденокарцинома	да
29	Рак предстательной железы LuCar	Мыши	Аденокарцинома	да
30	Рак молочной железы MCF-7	Крысы	Аденокарцинома	да
31	Трижды отрицательный рак	Голые мыши	Аденокарцинома	да

	молочной железы MDA-MB231			
32	Рак матки MES SA/Dx5	Голые мыши	Саркома	да
33	Глиобластома 22 GSC	NOD-мышь SCID (ортотопический)	Глиома	да
34	Глиобластома 105 GSC	NOD-мышь SCID (ортотопический)	Глиома	да
35	Рак молочной железы 4T1	Эндогенные мыши (ортотопический)	Аденокарцинома	да
36	Рак мочевого пузыря SV40	Мышь (ортотопический)	Аденокарцинома	да
37	Рак предстательной железы MatLyLu	Крысы	Аденокарцинома	да
38	Walker256	Крысы	Аденокарцинома	да
39	TRAMP простата	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
40	Рак толстой кишки CT26	Мышь SCID	Аденокарцинома	да
41	Рак Pirc толстой кишки	Аутохтонные крысы Pirc	Аденокарцинома	да
42	Рак кишечника мыши min	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
43	Меланома	Мыши	Аденокарцинома	да
44	SCC Карцинома сквамозных клеток молочной железы	ArcMin/+ мышь	Карцинома сквамозных клеток	да
45	AC Аденокарцинома молочной железы	ArcMin/+ мышь	Аденокарцинома	да
46	Гепатоклеточная карцинома	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
47	Глиома L9	Ксенотрансплантат крысы	Глиома	да
48	Глиома C6	Ксенотрансплантат крысы	Глиома	да
49	Глиома CNS1	Ксенотрансплантат крысы	Глиома	да
50	Глиома RG2	Ксенотрансплантат крысы	Глиома	да
51	Ретинобластома	Эндогенные мыши	Бластома	да
52	Рак поджелудочной железы с-тус	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
53	Рак поджелудочной железы Kras	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
54	Рак шейки матки HPV	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
55	Рак пищевода	Эндогенные мыши	Аденокарцинома	да
56	Кишечный полип	Эндогенные мыши	Аденома	нет
57	Альвеолярная гиперплазия молочной железы	Эндогенные мыши	Гиперплазия (доброкачественная)	нет
58	Гепатома Hep-3B	Голые мыши	Карцинома	нет
59	Гепатома Hep-G2	Голые мыши	Карцинома	нет
60	Аденома толстой кишки крыс Pirc	Крысы Pirc	Аденома	нет

*Потребление в опухоли считается положительным, если соотношение между опухолью и мышцами больше чем 3. Соотношение между опухолью и мышцами равно или меньше чем 2 считается отрицательным.

Пример 6. Клиническое исследование для оценки пациентов с немелкоклеточной карциномой легких ("NSCLC") с использованием CLR1404.

Хотя CLR1404 демонстрирует селективное и пролонгированное удержание в опухоли на моделях

ксенотрансплантатов 55/60 грызунов и на спонтанных моделях грызунов, врач, спонсируемый IND, начал клиническую оценку агента на пациентах людях с NSCLC в стадии 4 для определения того, проявляются ли сходные свойства потребления и удерживания в опухоли на людях. К настоящему времени получены изображения для двух пациентов с запущенной NSCLC после инъекции <1 мКюри ^{131}I -CLR1404. Образцы крови и мочи собирают в заданные моменты времени, и осуществляют получение гамма-изображений в нескольких временных точках после введения. У обоих пациентов значительное потребление и удерживание CLR1404 в опухоли демонстрируется в первичной опухоли легких, как видно на фиг. 6. По сравнению с высокими значениями потребления в печени, наблюдаемыми ранее для его предшественника первого поколения NM324, активность в печени и абдоминальная активность для CLR1404 гораздо ниже, что говорит о возможности оценки этого агента для других абдоминальных раковых заболеваний, включая рак поджелудочной железы, толстой кишки и предстательной железы.

Материалы и методы.

После внутривенной инъекции меченого йодом-131 CLR1404 (1 мКюри/20 мкг) пациентов с запущенной NSCLC сканируют через 3, 6, 24, 48, 96 ч и в дни 7 и 11 на сканере со сдвоенной головкой SPECT GE Maxxus. Образцы крови и мочи собирают для анализа фармакокинетики, а также для клинического биоанализа гематологии, почек и печени.

Результаты.

Начальные качественные результаты получения изображений показывают, что меченый йодом-131 CLR1404 четко локализуется в билатеральных пульмонарных массах уже через 24 ч после инъекции и селективно удерживается в этих опухолях более 11 дней. Кроме того, фоновая радиоактивность в печени и в нижней абдоминальной области, включая мочевой пузырь, почки и кишечник, значительно меньше, чем наблюдалось ранее для его предшественника, NM324. Не наблюдается отрицательных реакций ни одного из пациентов.

Выводы.

Эти предварительные данные говорят о том, что CLR1404 демонстрирует сходные свойства потребления и удерживания в опухоли при NSCLC человека, как наблюдалось ранее на моделях грызунов. Хотя и на основе только двух пациентов в данный момент, видно, что CLR1404 действительно локализуется в опухоли и подвергается селективному и пролонгированному удерживанию в опухоли при немелкоклеточном раке легких человека.

Пациент 1.

Мужчина в возрасте 55 лет с билатеральной NSCLC с 3-см опухолью в левой доле и инфильтратом в правой доле и метастазами в головном мозге и с небольшой массой в правом надпочечнике. Для его лечения применялись многочисленные стандартные и экспериментальные режимы лечения. Изображения показаны на фиг. 6A-C.

Пациент 2.

Мужчина в возрасте 70 лет с недавно диагностированной 6-см немелкоклеточной карциномой легких в верхней доле, с 5-см массой в печени, с метастазами в подвздошной кости и очень малыми метастазами в головном мозге. Он недавно завершил химиотерапию с низкими дозами карбоплатина/таксола и паллиативную радиационную терапию для метастаз в подвздошной кости и головном мозге, за неделю перед началом опытов с CLR1404. Изображения показаны на фиг. 6D-G.

Пример 7. Детектирование 3 ранее неизвестных метастаз опухоли в головном мозге у пациента с NSCLC с использованием ^{124}I -CLR1404.

Материалы и методы.

PET сканирование головного мозга человека осуществляют на 64-срезовом сканере PET/CT (Discovery VCT, General Electric) во множестве временных точек после инъекции примерно 5 мКюри ^{124}I -CLR1404 с использованием 90-минутной последовательности динамического получения данных (2D, девять рамок, по 10 мин каждая, включен режим VIP list), и данные реконструируются [Advantage Workstation version AW4.4, General Electric, 30-СМ DFOV (поле зрения дисплея), 128×128, OSEM VUE Point, 10 подмножеств с двумя итерациями, стандартная ось z, корректировка ослабления и мертвое время, разброс и корректировка затухания.

Результаты.

Предварительные результаты получены для пациента с NSCLC без неврологических симптомов с использованием PET/CT ^{124}I -CLR1404. Получение изображений показывает три ранее неизвестных повреждения головного мозга очень похожих на метастазы, которые впоследствии подтверждаются с помощью MRI, усиленного гадолинием (фиг. 7).

Пример 8. Детектирование рецидива опухоли с метастазами в правой передней части области серпа мозга с использованием ^{124}I -CLR1404.

Рецидивирующие метастазы в головном мозге у женщины возрастом 60 лет со злокачественной меланомой. Изображения с помощью магнитного резонанса ("MR") (фиг. 8A) и изображения PET ^{124}I -CLR1404 (фиг. 8B), и изображения через 8 месяцев после стереотаксической радиационной хирургии рецидива опухоли с метастазами в правой передней области серпа мозга (фиг. 8C) показывают с помощью CLR1404 область аномальной активности (стрелка). Соответствующее усиление области при на-

чальном получении изображений MR интерпретируется как радиационный некроз по сравнению с возможным рецидивом. Последующее получение изображений MR показывает дальнейшее увеличение размера неспецифично усиливаемого очага, в сочетании с увеличением отека вокруг повреждения, что указывает на рецидив злокачественной опухоли. Эти результаты показывают, что ^{124}I -CLR1404 секвестрируется раковыми клетками, которые являются стойкими к радиационной хирургии, и возможно, устанавливают рецидивирующую опухоль.

Соединения по настоящему изобретению включают противораковые лекарственные средства, связанные с сердцевинной молекулой CLR1404. Эти соединения можно нацеливать на раковые клетки и раковые стволовые клетки, включая раковые клетки головного мозга таким образом, что противораковое лекарственное средство секвестрируется и удерживается раковой клеткой. Эти соединения обеспечивают первое нацеленное лечение рака, которое можно адаптировать для специфичного введения набора противораковых лекарственных средств в раковые клетки, как для лечения рака, так и для предотвращения метастазирования и рецидива.

Пример 9. Конъюгаты паклитаксела и IC50 для различных линий раковых клеток.

Способ.

Линии раковых клеток, включая MDA-MB-468 (рак молочной железы), NCI-H1299 (рак легких), NCI-H460 (рак легких), Саран-2 (рак поджелудочной железы), MiaPaCa-1 (рак поджелудочной железы), HT29 (рак толстой и прямой кишки), HCT116 (рак толстой и прямой кишки) и PC-3 (рак предстательной железы) обрабатывают последовательными концентрациями паклитаксела и конъюгатами CLR1404-паклитаксел (то есть CLR1601, CLR1602 и CLR1603). Затем линии клеток измеряются относительно жизнеспособности клеток, и она регистрируется как IC50 для каждого вида лечения.

Результаты.

CLR1601 и CLR1603 могут уменьшать жизнеспособность для каждой линии раковых клеток из MDA-MB-468 (рак молочной железы), NCI-H1299 (рак легких), NCI-H460 (рак легких) Саран-2 (рак поджелудочной железы), MiaPaCa-1 (рак поджелудочной железы), HT29 (рак толстой и прямой кишки), HCT116 (рак толстой и прямой кишки) и PC-3 (рак предстательной железы; см. фиг. 9-16 соответственно. IC50 для каждого конъюгата паклитаксел-CLR1404 (то есть CLR1601 и CLR1603) и паклитаксела приведены в табл. 2. IC50 для CLR1602 не показаны, однако CLR1602 не может значительно уменьшить жизнеспособность линии раковых клеток, поскольку CLR1602 не гидролизуется. In vivo свободный паклитаксел потребляется клетками раковых опухолей при гораздо более низкой доле из-за неспецифической природы потребления паклитаксела. Таким образом, количество конъюгата PLE-паклитаксела, необходимое для гибели раковых клеток in vivo, должно быть таким же, как для паклитаксела, или меньшим и может давать в результате сильно уменьшенную токсичность для не раковых клеток.

Таблица 2

IC50 для CLR1601, CLR1603 и паклитаксела

	CLR1601	CLR1603	Паклитаксел
MDA-MB-468 (рак молочной железы)	3,77 нМ	3,42 нМ	1,9 нМ
NCI-H1299 (рак легких)	60,3 нМ	108 нМ	1,82 нМ
NCI-H460 (рак легких)	29,5 нМ	171,1 нМ	1,66 нМ
Саран-2 (рак поджелудочной железы)	56,7 нМ	83,6 нМ	7,91 нМ
MiaPaCa-1 (рак поджелудочной железы)	37,3 нМ	38,9 нМ	1,32 нМ
HT29 (рак толстой и прямой кишки)	92,2 нМ	70,6 нМ	1,07 нМ
HCT116 (рак толстой и прямой кишки)	7,6 нМ	11 нМ	0,87 нМ
PC-3 (рак предстательной железы)	34,4 нМ	29,5 нМ	0,9 нМ

Пример 10. Анализы проточной цитометрии.

Методы.

Окрашивание Annexin V и PI (фосфатидилинозитидом) с проточной цитометрией используют для определения процентов живых, ранних апоптотических, поздних апоптотических и некротических клеток. Вкратце, клетки обрабатывают цитотоксичными агентами и окрашивают с помощью набора для мечения Annexin V/PI (Life Technologies). Клетки анализируются на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences). Как показано в табл. 3-9, клетки классифицируются как живые (Annexin V -отрицательные, PI - отрицательные), ранние апоптотические (Annexin V положительные, PI - отрицательные), поздние апоптотические (Annexin V - положительные, PI - положительные) и некротические (Annexin V - отрицательные, PI - положительные). Репрезентативный график разброса показан на фиг. 17 для клеток MDA-MB-468, обработанных 5 мкМ CLR1601 в течение 72 ч. Содержание Annexin V (присоединенного к AlexaFluor 488) показано по оси x, при этом содержание PI показано по оси y. Нижний левый квадрант показывает живые клетки, верхний левый квадрант показывает некротические клетки, верхний правый квадрант показывает поздние апоптотические клетки и нижний правый квадрант показывает ранние апоптотические клетки. Остатки исключаются из этого анализа.

Результаты.

Клетки MDA-MB-468, линию клеток трижды отрицательного рака молочной железы обрабатывают конъюгатами CLR (CLR1601 и CLR1603) в течение 72 ч и паклитакселом ("PTX") в течение 24 ч; см. табл. 3. Клетки MDA-MB-468, также обрабатывают конъюгатами CLR (CLR1606 и CLR1607) в течение 72 ч и гелданамицином ("GEL") в течение 4; см. табл. 4. Для конъюгатов PTX жизнеспособность клеток уменьшается от 61,1% (без лечения лекарственным средством) до 17,0, 17,8, 22,2, 19,7, 53,8 и 48,9% после лечения 1 мкМ CLR1601, 5 мкМ CLR1601, 1 мкМ CLR1603, 5 мкМ CLR1603, 100 нМ PTX и 1 мкМ PTX соответственно; см. табл. 3. Для конъюгатов GEL жизнеспособность клеток уменьшается от 61,1 до 58,8, 42,7, 52,7, 56,9 и 26,2% после лечения 1 мкМ CLR1606, 10 мкМ CLR1606, 1 мкМ CLR1607, 10 мкМ CLR1607 и 1 мкМ GEL соответственно; см. табл. 4.

Таблица 3

MDA-MB-468, обрабатываемые конъюгатами паклитаксела в течение 72 ч

MDA-MB-468 (% от общего количества клеток)	72 часа без лекарственн ого средства	CLR160 1 (1 мкМ)	CLR160 1 (5 мкМ)	CLR160 3 (1 мкМ)	CLR160 3 (5 мкМ)	PTX (100 нМ)	PTX (1 мкМ)
Живые	61,1	17	17,8	22,2	19,7	53,8	48,9
Некротическ ие	2,83	15,8	21,6	22	22,5	8,89	10,8
Поздние апоптотичес кие	20,5	57,5	57,9	49,1	55,2	31,4	34,8
Ранние апоптотичес кие	15,5	9,83	2,71	6,74	2,65	5,9	5,5

Таблица 4

Клетки MDA-MB-468, обработанные конъюгатами гелданамицина в течение 72 ч

MDA-MB-468 (% от общего количества клеток)	72 часа Без лекарственного средства	CLR1606 (1 мкМ)	CLR1606 (10 мкМ)	CLR1607 (1 мкМ)	CLR1607 (10 мкМ)	GEL (1 мкМ)
Живые	61,1	58,8	42,7	52,7	56,9	26,2
Некротически е	2,83	2,31	19,4	1,62	1,63	16,3
Поздние апоптотическ ие	20,5	25,7	33,8	25,1	26,4	37,9
Ранние апоптотическ ие	15,5	13,2	4,13	20,6	15,1	19,6

Клетки COLO 829, линию клеток меланомы обрабатывают конъюгатами GEL (CLR1606 и CLR1607) в течение 72 ч и GEL в течение 48 ч; см. табл. 5. Жизнеспособность клеток уменьшается от 80,8% (без лечения лекарственным средством) до 70,4, 21,1, 67,9, 54,3, 32,4 и 18,6% после лечения с 1 мкМ CLR1606, 10 мкМ CLR1606, 1 мкМ CLR1607, 10 мкМ CLR1607, 100 нМ GEL и 1 мкМ GEL соответ-

ственно; см. табл. 5.

Таблица 5

Клетки COLO 829, обработанные конъюгатами гелданамицина в течение 72 ч

COLO 829 (% от общего количества клеток)	72 часа Без лекарственно го средства	CLR160 6 (1 мкМ)	CLR160 6 (10 мкМ)	CLR160 7 (1 мкМ)	CLR160 7 (10 мкМ)	GEL (100 нМ)	GEL (1 мкМ)
Живые	80,8	70,4	21,1	67,9	54,3	32,4	18,6
Некротическ ие	1,74	1,59	28,6	2,36	16,1	4,9	6,42
Поздние апоптотическ ие	4,18	6,7	40,1	9,05	20,9	40,8	53,7
Ранние апоптотическ ие	13,3	21,3	10,2	20,7	8,69	21,9	21,4

Клетки PANC-1, линию клеток рака поджелудочной железы, обрабатывают конъюгатами GEL (CLR1606 и CLR1607) в течение 72 ч и GEL в течение 48 ч; см. табл. 6. Жизнеспособность клеток уменьшается от 44,2% (без лечения лекарственным средством) до 42,0, 21,5, 44,0, 33,0, 23,3 и 18,9% после лечения с 1 мкМ CLR1606, 10 мкМ CLR1606, 1 мкМ CLR1607, 10 мкМ CLR1607, 100 нМ GEL и 1 мкМ GEL соответственно; см. табл. 6.

Таблица 6

Клетки PANC-1, обработанные конъюгатами гелданамицина в течение 72 ч

PANC-1 (% от общего количества клеток)	72 часа без лекарствен ного средства	CLR160 6 (1 мкМ)	CLR160 6 (10 мкМ)	CLR160 7 (1 мкМ)	CLR1607 (10 мкМ)	GEL (100 нМ)	GEL (1 мкМ)
Живые	44,2	42	21,5	44	33	23,3	18,9
Некротическ ие	47,9	46,8	65,3	48,1	54,7	59,4	66,4
Поздние апоптотическ ие	5,65	8,63	12,6	4,83	9,81	12,6	12,8
Ранние	2,23	2,59	0,63	3,1	2,43	4,68	1,93
апоптотическ ие							

Клетки 22RV1, линию клеток рака предстательной железы, обрабатывают конъюгатами GEL (CLR1606 и CLR1607) в течение 72 ч и GEL в течение 48 ч; см. табл. 7. Жизнеспособность клеток составляет 20,3, 21,3, 16,0, 21,9, 15,7, 19,4 и 28,1% после лечения без лекарственного средства, 1 мкМ CLR1606, 10 мкМ CLR1606, 1 мкМ CLR1607, 10 мкМ CLR1607, 100 нМ GEL и 1 мкМ GEL соответственно; см. табл. 7. Гибель базальных клеток является высокой для этой линии клеток; клетки не реагируют, как следует, на способ сбора клеток.

Таблица 7

Клетки 22RV1, обработанные гелданамицином в течение 72 ч

22RV1 (% от общего количества клеток)	72 часа Без лекарствен ного средства	CLR1606 (1 мкМ)	CLR160 6 (10 мкМ)	CLR160 7 (1 мкМ)	CLR160 7 (10 мкМ)	GEL (100 нМ)	GEL (1 мкМ)
Живые	20,3	21,3	16	21,9	15,7	19,4	28,1
Некротическ ие	49,5	51,7	57,7	55,2	59,1	47,1	46,6
Поздние апоптотическ ие	26,2	23,4	22,9	20,7	23,1	28,4	19,1
Ранние апоптотическ ие	4,1	3,63	3,44	2,27	2,19	5,09	6,22

Конъюгаты CLR видимо требуют более продолжительного периода обработки вместе с клетками для индуцирования гибели клеток. Обработка клеток MDA-MB-468 1 мкМ CLR1601 и 1 мкМ CLR1603 в течение 48 ч дает в результате уменьшение жизнеспособности клеток от 86,2% (без лечения лекарственным средством) до 79,4 и 81,4% соответственно; см. табл. 8. Обработка клеток COLO 829 1 мкМ CLR1606 и 1 мкМ CLR1607 в течение 48 ч дает в результате уменьшение жизнеспособности клеток от 91,7% (без лечения лекарственным средством) до 90,1 и 82,7% соответственно; см. табл. 9.

Таблица 8

MDA-MB-468, обработанные конъюгатами паклитаксела в течение 48 ч

MDA-MB-468 (% от общего количества клеток)	48 часов Без лекарственного средства	CLR1601 (1 мкМ)	CLR1603 (1 мкМ)	PTX (100нМ)	PTX (1 мкМ)
Живые	86,2	79,4	81,4	77,9	73,3
Некротически е	2,87	13,1	12,4	14,1	15,6
Поздние апоптотическ ие	8,33	6	4,78	5,54	9,18
Ранние апоптотическ ие	2,56	1,49	1,4	2,47	1,97

Таблица 9

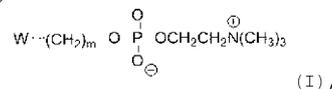
Клетки COLO 829, обработанные конъюгатами гелданамицина в течение 48 ч

COLO 829 (% от общего количества клеток)	48 часов Без лекарственного средства	CLR1606 (1 мкМ)	CLR1607 (1 мкМ)	GEL (100 нМ)	GEL (1 мкМ)
Живые	91,7	90,1	82,7	36,1	24,6
Некротическ ие	5,96	6,91	8,94	22,7	22,7
Поздние апоптотичес кие	1,67	2,2	5,54	29	38,3
Ранние апоптотичес кие	0,72	0,79	2,77	12,2	14,4

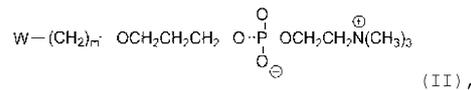
В целом, конъюгаты PLE-паклитаксел и PLE-гелданамицин, как показано, могут уменьшать жизнеспособность опухолевых клеток, вызывая гибель клеток для разнообразных типов опухолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

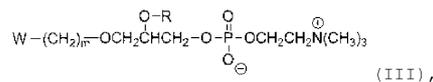
1. Терапевтическое соединение, охарактеризованное формулой A-B-D, где A представлено формулой (I)



или формулой (II)

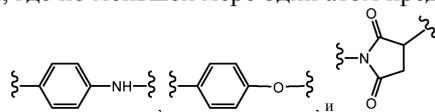


или формулой (III)



или их комбинацией,

где W выбирают из группы, состоящей из фенила, C₁-C₆-алкила, C₃-C₆-циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего циклическую группу из 3-6 атомов, выбранных из группы, состоящей из углерода, азота, серы, фосфата и кислорода, где по меньшей мере один атом представляет собой углерод



где R представляет собой H или C₁-C₂₄-алкил и где m представляет собой целое число от 12 до 24;

V представляет собой линкер, выбранный из связи и соединения формулы (IV): Y-(CH₂)_n-Z(IV),

где Y связывается с A;

Z связывается с D;

Y выбирают из группы, состоящей из связи, O, NH, C=O, NHSO₂O и OC(=O)O;

Z выбирают из группы, состоящей из O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂ и -S-S-; и

n представляет собой целое число от 0 до 6; и

D представляет собой противораковое лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из паклитаксела, иринотекана, топотекана, гемцитабина, цисплатина, гелданамицина и мерганзина.

2. Терапевтическое соединение по п.1,

где A представляет собой соединение формулы (I), где W представляет собой  и m равно 18;

V представляет собой соединение формулы (IV), где Y представляет собой C=O и Z представляет собой C=O, C(=O)NH или C(=O)O и n равно 3 или 4; и

D представляет собой паклитаксел.

3. Терапевтическое соединение по п.1,

где A представляет собой соединение формулы (I), где W представляет собой  и m равно 18;

V представляет собой связь или соединение формулы (IV), где Y представляет собой C=O, Z представляет собой NH и n равно 1 или 3; и

D представляет собой гелданамицин.

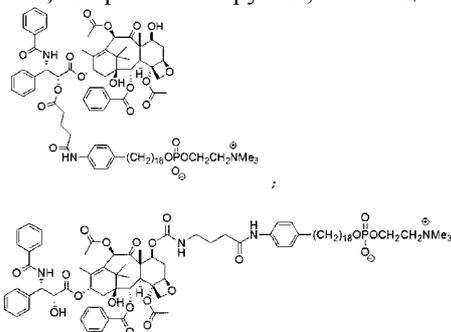
4. Терапевтическое соединение по п.1,

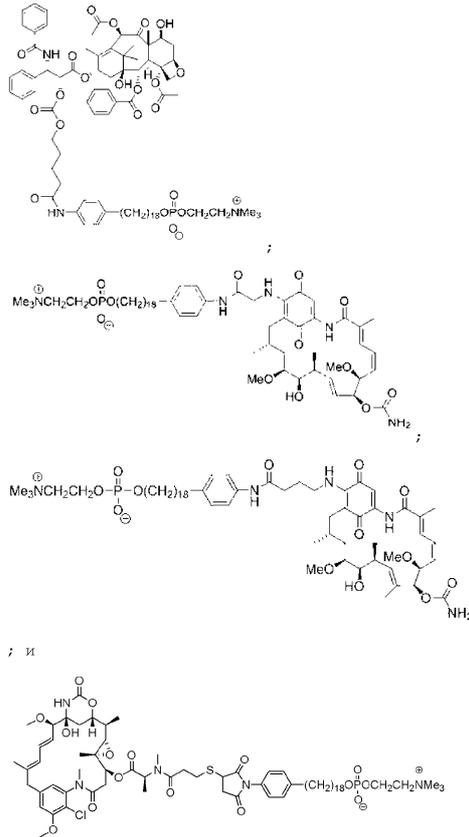
где A представляет собой соединение формулы (I), где W представляет собой  и m равно 18;

V представляет собой связь и

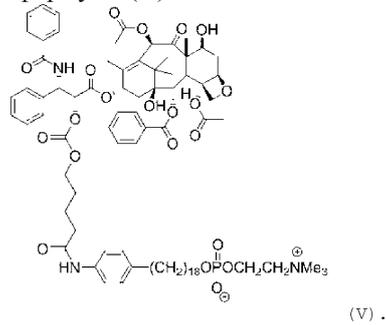
D представляет собой мерганзин.

5. Терапевтическое соединение, выбранное из группы, состоящей из





6. Терапевтическое соединение формулы (V)



7. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая терапевтическое соединение по пп.1, 5 или 6 и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

8. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества терапевтического соединения по пп.1, 5 или 6 пациенту с раковым заболеванием.

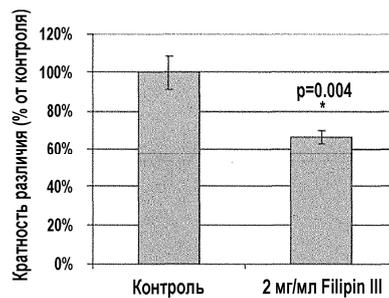
9. Способ по п.8, в котором рак включает раковые стволовые клетки.

10. Способ по п.8, в котором рак является рецидивирующим.

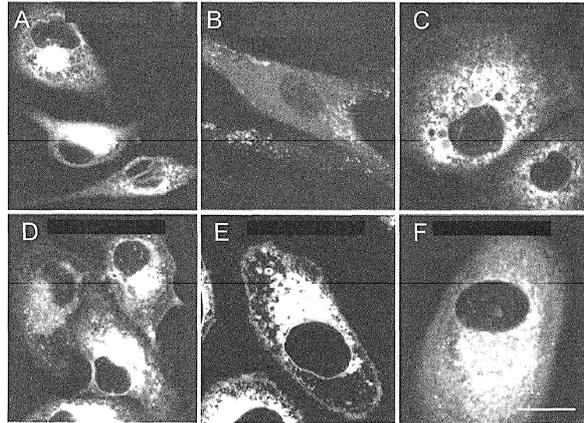
11. Терапевтическое соединение по п.1, где D представляет собой паклитаксел.

12. Терапевтическое соединение по п.1, где D представляет собой гелданамицин.

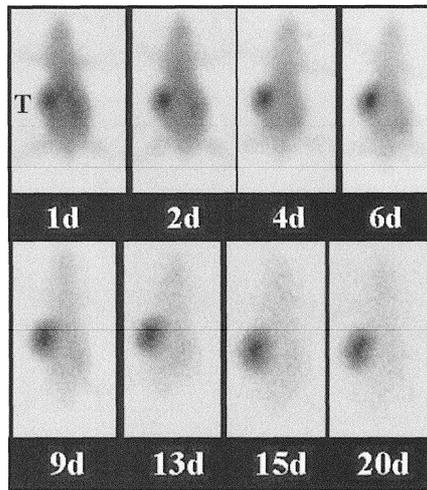
13. Терапевтическое соединение по п.1, где D представляет собой мертанзин.



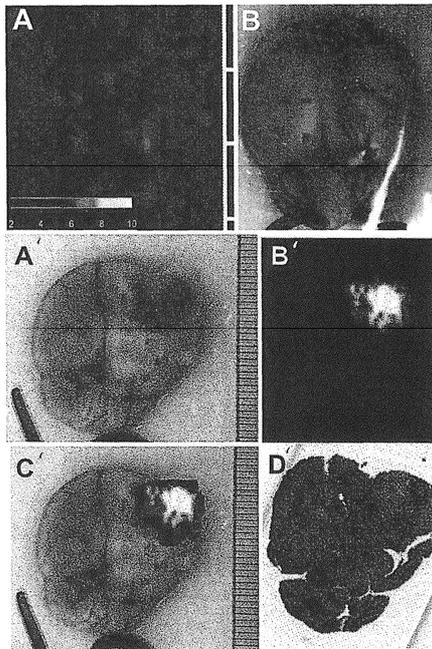
Фиг. 1



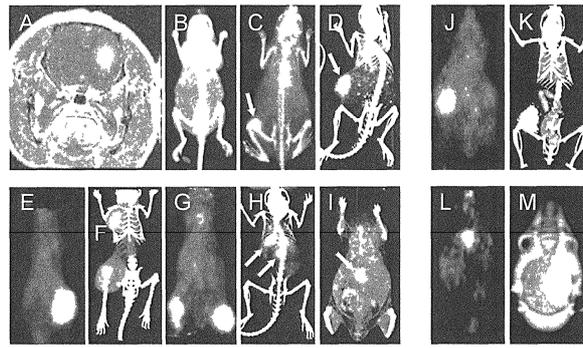
Фиг. 2



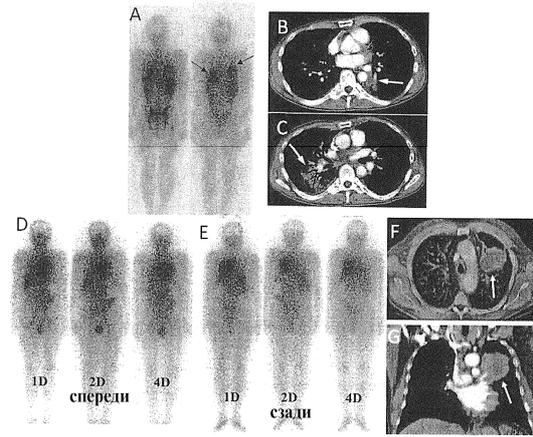
Фиг. 3



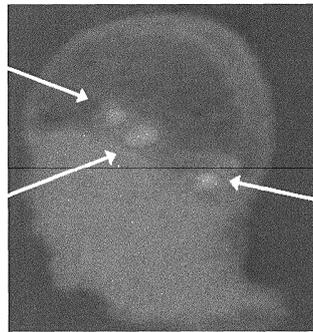
Фиг. 4



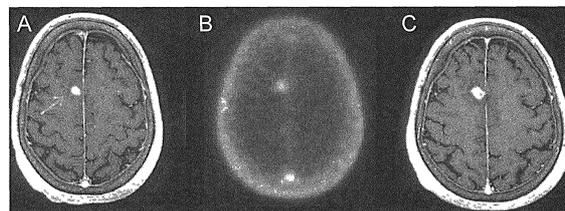
Фиг. 5



Фиг. 6

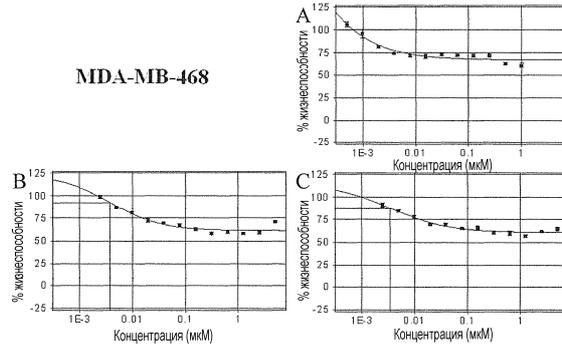


Фиг. 7



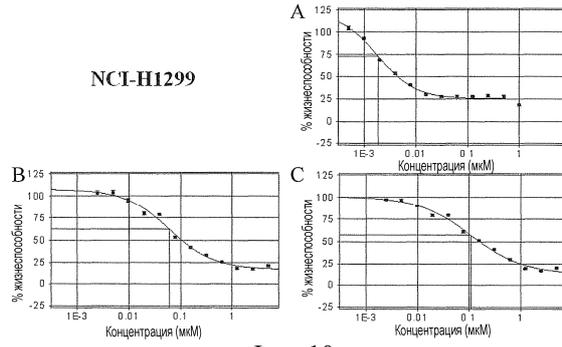
Фиг. 8

MDA-MB-468



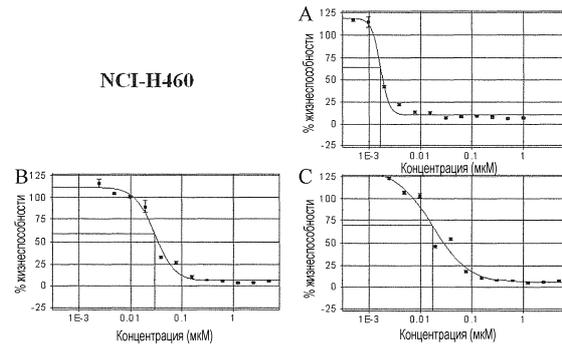
Фиг. 9

NCI-H1299



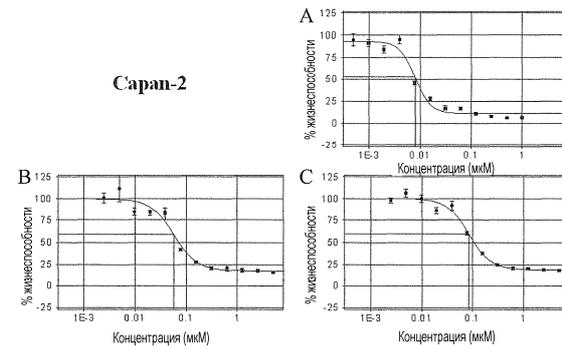
Фиг. 10

NCI-H460

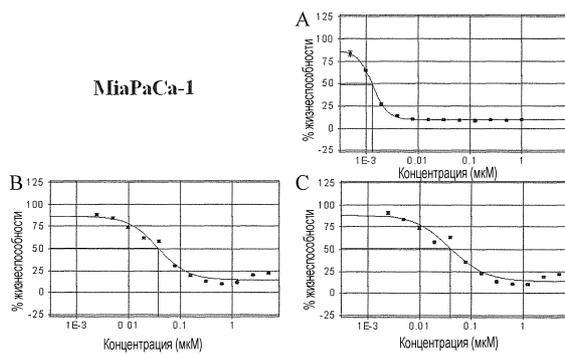


Фиг. 11

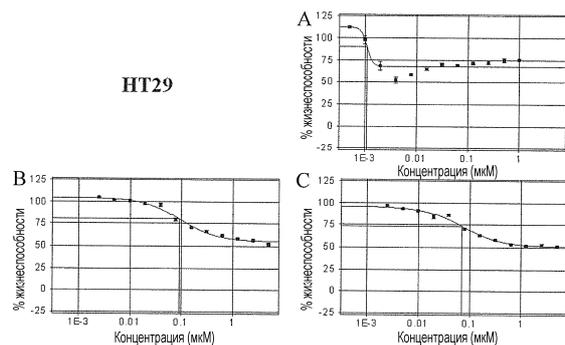
Сарап-2



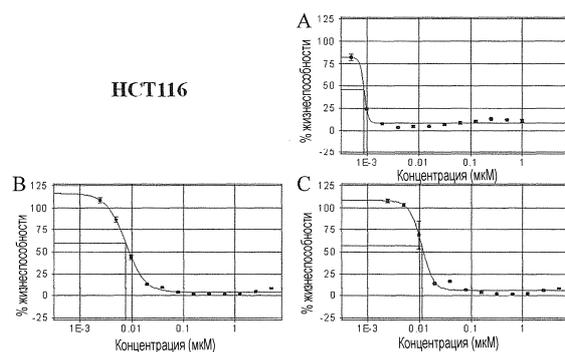
Фиг. 12



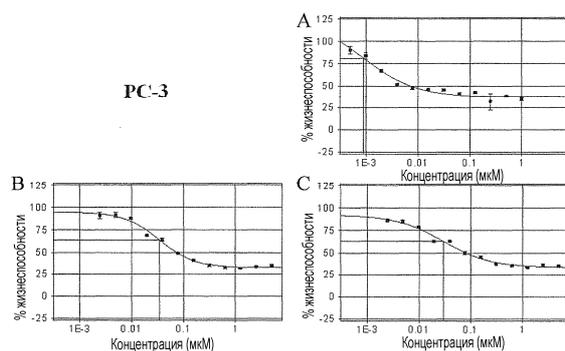
Фиг. 13



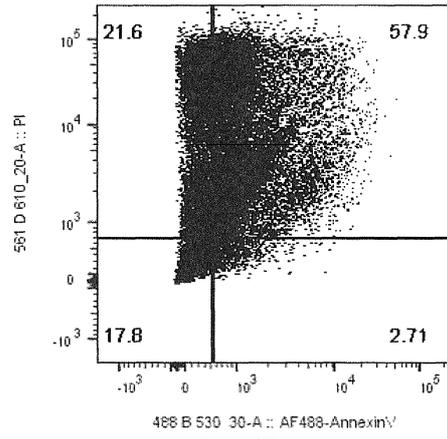
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

