

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038278**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.08.04**

**(21)** Номер заявки  
**201992517**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.06.27**

**(51)** Int. Cl. *A61K 47/61* (2017.01)  
*A61K 47/56* (2017.01)  
*A61K 47/50* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

**(54) КОНЬЮГАТ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЛЕНАЛИДОМИДА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

---

**(31)** 61/871,352; 14/308,972

**(32)** 2013.08.29; 2014.06.19

**(33)** US

**(43)** 2020.03.31

**(62)** 201690487; 2014.06.27

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ХОУЛИ СТОУН БАИОТЕК КО., ЛТД.**  
**(GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Линь Хуа-Ян (TW)**

**(74)** Представитель:  
**Вахнин А.М. (RU)**

**(56)** WO-A1-2008134528

F. Leonelli et al.: "Design, Synthesis and Applications of Hyaluronic Acid-Paclitaxel Bioconjugates", MOLECULES 2008, 13, pp. 360-378 (документ полностью; в частности, фиг. 1 на с. 363)

K. AKIMA et al.: "Evaluation of Antitumor Activities of Hyaluronate Binding Antitumor Drugs: Synthesis, Characterization and Antitumor Activity", JOURNAL OF DRUG TARGETING, 1996, Vol. 4, pp. 1-8 (документ полностью; в частности, фиг. 1 на с. 4)

**(57)** Изобретение относится к конъюгату гиалуроновой кислоты и активного соединения, такого как леналидомид, где функциональная группа леналидомида связана ковалентной связью непосредственно с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты или ее соли. Конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по настоящему изобретению подходит для направленной доставки активного соединения при заболеваниях, характеризующихся сверхэкспрессией рецептора поверхности клетки CD44. Лекарственное средство применимо для лечения заболеваний, таких как воспаление, аутоиммунное заболевание, аллергия, инфекция и предпочтительно рак. Изобретение также относится к получению фармацевтических композиций для такого терапевтического лечения, а также к способу получения конъюгата.

**B1**

**038278**

**038278**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к конъюгату гиалуроновой кислоты и леналидомида, к способу его получения, а также к его применению.

### Уровень техники

Внеклеточный матрикс (ЕСМ) представляет собой динамическое скопление взаимодействующих молекул, которое регулирует функции клеток и взаимодействие в ответ на раздражение. Один класс макромолекул внеклеточного матрикса - это гликозаминогликаны, которые представляют собой молекулы, вовлеченные в обширный набор как нормальных, так и аномальных биологических процессов, включая миграцию клеток, дифференцировку, пролиферацию, иммунную реакцию и организацию цитоскелета.

Гликозаминогликаны (GAG) представляют собой неразветвленные полимеры, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев. Такие дисахаридные звенья всегда содержат аминсахар (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), который в большинстве случаев сульфирован, а второй сахар, как правило, представляет собой уроновую кислоту (глюкуроновую или идуроновую). GAG являются высоко отрицательно заряженными из-за присутствия карбоксильных или сульфатных групп в большинстве остатков их Сахаров, и как таковые, они являются в высокой степени гидрофильными. GAG имеют склонность принимать сильно растянутые конформации и образовывать матрицы, которые заполняют пространство и устойчивы к сжимающим усилиям. Различают четыре основные группы GAG по остаткам их Сахаров, типу связи между такими остатками и числу и местоположению сульфатных групп. Они включают (1) гиалуронан, (2) хондроитина сульфат и дерматана сульфат, (3) гепарана сульфат и гепарин и (4) кератана сульфат.

Гиалуронан (также называемый гиалуроновой кислотой или гиалуронатом или HA) является самым простым GAG. Он состоит из регулярной повторяющейся последовательности звеньев несulfированных дисахаридов, а именно N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. Его молекулярная масса может составлять от 400 Да (дисахарид) до нескольких миллионов дальтон. Он обнаружен в различных количествах во всех тканях, например в хрящевой ткани, и в частности он содержится в коже и глазах, и в большинстве, если не во всех, жидкостях организма взрослых животных. Его особенно много в эмбрионах на ранней стадии развития. В суставном хряще HA может образовывать большое скопление, которое важно для функции хряща. Кроме того, подвижность клетки и адгезия иммунных клеток опосредуются рецептором клеточной поверхности RHAMM (рецептор для подвижности, опосредуемой гиалуронаном) и CD44.

HA синтезируется непосредственно на внутренней мембране поверхности клетки путем выращивания полимера, который вытесняется через мембрану на наружную сторону клетки, по мере того как он синтезируется. Синтез опосредуется одним белковым ферментом гиалуронансинтазой (HAS). Напротив, другие GAG синтезируются внутри клетки в аппарате Гольджи, возможно, в ассоциации с неким коровым белком, и затем высвобождаются путем экзоцитоза. Расщепление HA в тканях позвоночных *in vivo* опосредуется гиалуронидазой и экзогликозидазами, которые последовательно удаляют сахара. Гиалуронидазы млекопитающих обладают как гидролитической, так и трансгликозидазной активностью и могут расщеплять HA и хондроитин. В соединительной ткани связанная с HA вода создает пространство между тканями, причем таким образом создается окружающая среда, способствующая движению и пролиферации клеток. HA играет ключевую роль в биологических явлениях, связанных с подвижностью клеток, включая быстрое развитие, регенерацию, репарацию, эмбриогенез, эмбриологическое развитие, заживление ран, ангиогенез и онкогенез.

CD44 (также известный как Pgp-1, Hermes-3, HSCAM, ECMR III) представляет собой широко экспрессируемый гликопротеин с молекулярной массой от 85 до 90 кДа. CD44 является главным рецептором поверхности клетки для гликозаминогликана - гиалуроновой кислоты (HA). CD44 специфически связывает HA, хотя им также могут быть узнаны некоторые протеогликаны, содержащие хондроитина сульфат. CD44 играет некую роль в различных клеточных и физиологических функциях, включая адгезию с HA и миграцию на HA, расщепление HA и метастазирование опухоли. Также показано, что CD44 играет роль в связывании внеклеточного матрикса, миграции клеток, активации лимфоцитов, хоминге лимфоцитов и пролиферации клеток гладких бронхиальных мышц (Gunthert et al., 1991, A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells, Cell, 5; 65(1): 13-24). Рецептор CD44 характеризуется сложной картиной альтернативного сплайсинга в своей варибельной области внеклеточного домена. Оказывается, CD44 является особенно важным рецептором лейкоцитов для HA и поэтому может играть роль в патогенезе астмы. Кроме того, уровни HA, которые повышались при экспериментальной астме у контрольных мышей, заметно ослабевали у мышей, обработанных антителами, что подтверждает роль CD44 в метаболизме HA (конкретно в расщеплении высокомолекулярного HA до провоспалительных низкомолекулярных форм). Это может быть особенно важно, поскольку образовавшиеся из HA олигосахариды могут связывать и активировать Toll-подобный рецептор. Безусловно, наиболее впечатляющей стороной результатов является абсолютная значительность благоприятного действия лечения против CD44.

Взаимодействия HA-CD44 могут играть важную роль в развитии, воспалении, рекрутинге и активации Т-клеток, воспалении легких и росте и метастазировании опухоли. Измененная экспрессия альтерна-

тивно сплайсированных транскриптов CD44 обнаружена при многих онкозаболеваниях, включая рак желудка (F. Reihani-Sabet et al., 2003, Effects of Inflammation and H. pylori Infection on Expression of CD44 Variant Exons in Gastric Tissue, Journal of Sciences, 14:11-16).

Клетки злокачественной опухоли могут селективно принимать пропорционально больше биоконъюгатов, чем здоровая соединительная ткань или мезенхимные клетки из-за сверхэкспрессии на них рецептора CD44. В некоторых исследованиях усиленный синтез и поглощение НА коррелирует с развитием рака и метастатическим потенциалом. Некоторые опухоли, включая многие из тех, которые обнаружены в легких, сверхэкспрессируют маркер клеточной поверхности CD44. Известно, что клетки рака молочной железы поглощают НА в большей степени, чем здоровые ткани, поскольку им требуется НА для высокой экспрессии Р-гликопротеина, вносящего основной вклад во множественную лекарственную устойчивость. Кроме того, клетки инвазивного рака молочной железы сверхэкспрессируют CD44 - основной рецептор для НА, и являются зависимыми от высоких концентраций CD44-интернализированного НА для пролиферации. Таким образом, химиотерапевтические лекарственные наноконъюгаты с НА могут быть эффективными против метастазов в лимфоузлах (Eliaz R. E. et al., 2004, Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells, Cancer Res., 61(6): 2592-601).

Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) и селективные ингибиторы циклооксигеназы (COX)-2 являются терапевтическими средствами, обычно используемыми для лечения боли, воспаления и лихорадки. В последнее время все больше опытных данных предполагают, что некоторые NSAID и селективные ингибиторы COX-2 также могут иметь противораковую активность за счет вовлечения во многие биологические события, происходящие в онкогенном процессе. Например, эпидемиологические исследования показали, что регулярное применение

аспирина снижает риск развития рака, в частности, толстой кишки (Sandier R.S. et al., 2003, A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer, New England J. Med., 348: 883-890). Также обнаружено, что антагонист COX-2, такой как целекоксиб, рофекоксиб, нимесулид, мелоксикам и этодолак, также может иметь противораковую активность (Yamazaki R. et al., 2002, Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells., FEBS Lett., 531(2): 278-84). Кроме того, COX-2 постоянно сверхэкспрессируется при многих предраковых и злокачественных состояниях и метастазирующих раковых заболеваниях человека, и показано, что при некоторых раковых заболеваниях уровни сверхэкспрессии значительно коррелируют с инвазивностью, прогнозом и продолжительностью существования (Dannenber A.J. et al., 2003, Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise, Cancer Cell, 4(6): 431-6). Максимальная эффективность обычно ограничивается дозой из-за связанной с COX-2 токсичностью; однако, на некоторых животных моделях рака толстой кишки, кожи, легких, мочевого пузыря и молочной железы показано, что ингибиторы COX-2 обладают подавляющим опухоль действием (Alane T. Koki et al., 2002, Celecoxib: A Specific COX-2 Inhibitor With Anticancer Properties, Cancer Control, 9(2 Suppl): 28-35).

В WO 94/09811 описывается применение CD44 при лечении воспаления или для обнаружения раковых метастазов. Авторы показывают, что CD44 положительно регулируется при воспалительных состояниях, и пептиды CD44 способны ингибировать активацию Т-клеток. Однако нет данных или предложений использовать CD44 для ингибирования метастазирования, и не показано и не предлагается применять CD44 для ингибирования роста опухоли или ангиогенеза. В WO 99/45942 раскрывается применение НА-связывающих белков и пептидов, включая CD44, для подавления рака и зависимых от ангиогенеза заболеваний. В этой заявке на патент используется метастатин - 38-кДа фрагмент связывающего белка хряща, а также НА-связывающий пептид, полученный из этого фрагмента, для ингибирования метастазов в легких мышшиной меланомы B16 и карциномы легких Льюиса. В случае НА-связывающего пептида ингибируется рост меланомы B-16 на куриной САМ и миграция эндотелиальных клеток на НА. В обеих заявках на патент применение НА-связывающих пептидов прямо соотносится с их способностью связывать гиалуроновую кислоту.

В патенте США № 8192744 показано, что растворимый рекомбинантный связывающий гиалуроновую кислоту домен CD44 (CD44HABD) ингибирует ангиогенез *in vivo* у цыплят и мышей и, следовательно, ингибирует у человека рост опухолей различного происхождения. Изобретение раскрывает растворимые негликозилированные рекомбинантные белки CD44 как новый класс ингибиторов ангиогенеза, основанных на нацеливании на рецептор поверхности клетки.

Таким образом, в цитированных выше работах из уровня техники раскрывается возможное применение CD44 и предполагается, что любое действие может зависеть от взаимодействия НА-CD44. Следовательно, вся полезность, приписываемая до сих пор конъюгату CD44-НА, непосредственно зависит от его способности связывать гиалуроновую кислоту.

Однако некоторые лекарственные средства пока не конъюгированы успешно с НА, и следует продолжать эксперименты для подтверждения возможной пригодности НА в качестве носителя для направленной доставки активного соединения. В частности, в уровне техники не показано, что взаимодействия между рецептором поверхности клетки CD44 и конъюгатом НА с активным соединением можно выгодно

использовать для целевой доставки такого активного соединения при заболеваниях, характеризующихся сверхэкспрессией CD44, получая при них эффективное терапевтическое улучшение.

В случае патологий, таких как, например, рак, действительно еще существует необходимость поиска доступных терапевтических инструментов, в которых уравновешано эффективное цитотоксическое действие против опухолевых клеток и цитотоксическое действие на здоровые клетки, и имеющих более хорошие профили безопасности.

#### **Сущность изобретения**

Целью настоящего изобретения является новое соединение, получаемое конъюгацией НА с активным соединением, подходящее для направленной доставки такого активного соединения при заболеваниях, характеризующихся сверхэкспрессией рецептора поверхности клетки CD44.

Поэтому настоящее изобретение относится к соединению, содержащему гликозаминогликан, который конъюгирован с лекарственным средством, при этом лекарственное средство используют для лечения заболеваний типа рака, которые тесно связаны с экспрессией CD44.

В первом аспекте объектом изобретения является соединение, состоящее из конъюгата из гиалуроновой кислоты и активного соединения, в котором активное соединение конъюгировано с помощью функциональной группы с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты, его производным или его солью с образованием ковалентного конъюгата, и при этом активное соединение - леналидомид.

Далее конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по настоящему изобретению предпочтительно используют для лечения раковых заболеваний.

Поэтому во втором аспекте объектом изобретения является применение конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида, для лечения рака и для получения фармацевтических композиций для такого терапевтического лечения.

Еще в одном аспекте объектом настоящего изобретения является способ получения конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида, где функциональная группа леналидомида связана ковалентной связью непосредственно с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты или ее соли

#### **Краткое описание чертежей**

Для более полного описания настоящего изобретения, характеристика его воплощений иллюстрируются прилагаемыми чертежами. Эти чертежи образуют часть описания. Однако данные чертежи не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

На фиг. 1 показана аффинность НА с помощью индекса флуоресценции в нормальных и поврежденных тканях толстой кишки.

На фиг. 2 показаны результаты флуоресценции соединения НА-краситель с различным временем воздействия, использованием клеточной линии НСТ 15 и клеточной линии НТ29, при этом на фиг. 2А представлена клеточная линия НСТ 15 через 6 ч; на фиг. 2В представлена клеточная линия НСТ 15 через 12 ч; на фиг. 2С представлена клеточная линия НТ29 через 6 ч; на фиг. 2D представлена клеточная линия НТ29 через 12 ч.

На фиг. 3 показана структура конъюгата НА-леналидомид.

На фиг. 4А показано цитотоксическое действие свободного леналидомида, НА и конъюгата НА-леналидомид на клеточную линию НТ29.

На фиг. 4В показано цитотоксическое действие свободного леналидомида, НА и конъюгата НА-леналидомид на клеточную линию НСТ 15.

#### **Подробное описание изобретения**

Цели, преимущества и новые особенности изобретения станут более очевидными из последующего подробного описания, взятого в сочетании с прилагаемыми чертежами.

Как правило, лекарственное средство, вводимое перорально или инъекционно в кровоток, должно прямо поступать в область, которая является мишенью его воздействия, однако поскольку концентрация и специфичность не столь высоки, действие лекарственного средства на болезнь-мишень и здоровые органы является весьма схожим. Таким образом, введение эффективных количеств активных соединений во многих случаях неполноценно и ограничено их профилями безопасности.

Для того, чтобы улучшить эффективность терапии, обеспечив при этом хороший профиль безопасности, по одной стратегии следует модифицировать лекарственное средство, чтобы оно было более мишень-селективным в отношении места заболевания, через ковалентную связь лекарственного средства с носителем. Такая потребность особенно чувствуется в области противораковой терапии, как отмечалось ранее.

С этой целью авторы изобретения задумали использовать взаимодействия между гиалуроновой кислотой (НА) и ее рецептором CD44 для направленной доставки активного вещества.

Намерение поддерживать относительно высокую концентрацию лекарственного средства в назначенном месте в отличие от здоровой ткани или органа закрепилось у авторов после длительных исследований и опытов с НА.

Результаты, из которых возникает настоящее изобретение, полностью описаны в примерах и коротко суммированы далее.

Действительно, настоящее изобретение основано на выявлении того, что гиалуроновая кислота с

различной средней молекулярной массой (MW) имеет более высокий индекс адгезии в пораженной ткани, чем в здоровой ткани, и что HA с более низкой средней молекулярной массой имеет качества лучше, чем HA с высокой средней молекулярной массой. В частности, как видно на фиг. 1, при сравнении различий среди HA с тремя средними молекулярными массами, адгезировавшихся на поврежденной ткани толстой кишки, измеряемый флуоресценцией индекс адгезии HA в 350 кДа к поврежденным тканям толстой кишки выше, чем у HA с двумя другими молекулярными массами (2000 кДа = 2 МДа, и 1000 кДа = 1 МДа). Далее измеряемый флуоресценцией индекс адгезии HA в 1 МДа даже к здоровым или поврежденным тканям толстой кишки был выше, чем у HA в 2 МДа. Такой результат подтверждает, что HA может более специфически прикрепляться в месте воспаления, что побудило авторов продолжать работать над настоящим изобретением и удостоверится в том, может ли сохраниться такая исключительная особенность тканевой адгезии гиалуроновой кислоты, вероятно связанная с взаимодействием HA с рецептором поверхности клетки CD44, когда такой гликозаминогликан конъюгирован с другими соединениями.

Поэтому авторы дополнительно конъюгировали лекарственное средство с HA для того, чтобы проверить, можно ли использовать HA в качестве носителя для направленной доставки для сопровождения лекарственного средства к области изобилующей CD44. Как упоминалось выше, когда CD44 сверхэкспрессируется в ситуации наличия воспаления, инфекции или рака, соответствующее лекарственное средство может легко поступить в намеченное место и оставаться в относительно высокой концентрации там вследствие того, что лиганд HA присоединяется к рецептору CD44. В сочетании с эффектом адгезии HA к области воспаления или области изобилующей CD44, конъюгированное лекарственное средство должно, в частности, скапливаться на намеченном участке усиливая эффективность терапии благодаря относительно более высокой концентрации лекарственного средства в этой области, что сочетается со снижением количества используемого лекарственного средства, обеспечивая более хороший профиль безопасности.

Для того, чтобы подтвердить, что лекарственное средство или краситель успешно конъюгированы с HA и также подтвердить эффект присоединения HA, авторы настоящего изобретения проводили опыты, включающие конъюгирование красителя с HA (HA-краситель) и введения полученного соединения по отдельности клеточным линиям и мышам. На фиг. 2A и 2B показаны данные опытов, с различным временем воздействия на клеточную линию НСТ 15 (колоректальная аденокарцинома с меньшим количеством CD44), и на фиг. 2C и фиг. 2D показаны данные опытов с различным временем воздействия на клеточную линию НТ29 (колоректальная аденокарцинома с большим количеством CD44). Результаты для НТ29 (фиг. 2C и фиг. 2D) показывают, что HA-краситель успешно конъюгирован и присоединяется к области изобилия CD44 в НТ29 (фиг. 2C) и даже проникает в клетки НТ29 (фиг. 2D). Это означает, что предположение настоящего изобретения правильное и эффективное, и также означает, что лекарственное средство или краситель можно конъюгировать с HA, и что HA сохраняет свою способность связывать CD44.

Особенности присоединения свободного красителя и HA-красителя в клеточных линиях НТ29 и НСТ у 15 мышей анализировали в течение 4 недель. Свободный краситель инъецировали в хвостовую вену мышей. Результат показывает, что наличие экспрессии CD44 раковыми клетками двух различных видов не сказывается на результате присоединения. Отношение площади присоединения НТ29 составляет 50,15%, в то время как НСТ 15 составляет 49,86%. Однако, когда в хвостовую вену мышей инъецировали HA, конъюгированную с красителем, у раковых клеток НТ29 с более высокой экспрессией CD44 наблюдалась высокая концентрация HA, конъюгированной с красителем, а в НСТ 15 с меньшей экспрессией CD44 наблюдался весьма ограниченный результат. Отношение площади присоединения НТ29 составляет 74,15%, в то время как НСТ 15 составляет 25,85%. Результат указывает на то, что когда краситель конъюгирован с HA, концентрация красителя в некой области может повышаться вследствие присоединения HA к области множества CD44.

Заболевания, тесно связанные с CD44, включают рак, инфекцию и воспаление. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения, например, рак включает карциному толстой кишки, фибросаркому, рак молочной железы, аденокарциному и злокачественную глиому головного мозга.

В описании и в формуле изобретения термин "лекарственное средство" или "активное соединение" или "агент", в целях настоящего изобретения, может включать противораковое лекарственное средство. Большинство противораковых лекарственных средств можно разделить на алкилирующие средства, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы и иные противораковые лекарственные средства.

В предпочтительном воплощении входящее в конъюгат противораковое лекарственное средство включает леналидомид.

Леналидомид - 4-аминоглутамильный аналог талидомида является синтетическим соединением, полученным путем модификации химической структуры талидомида для улучшения его действенности и уменьшения его побочного тератогенного и неврологического действия (V. Kotla et al., 2009, Mechanism of action of Lenalidomide in hematological malignancies, Journal of Hematology and Oncology, 2: 36). Показано, что леналидомид имеет антиангиогенную, противораковую и иммуномодулирующую активность,

которая реализуется из-за эпизодической иммуномодулирующей активности при нодозной лепроматозной эритеме (ENL) (J. Sheskin, 1980, The treatment of lepra reaction in lepromatous leprosy, *International Journal of Dermatology*, 6: 318-322) и при аутоиммунных расстройствах (E. Atra and E. I. Sato, 1993, Treatment of the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus with thalidomide. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 11(5): 487-93). Обнаружено, что леналидомид имеет антиангиогенные свойства и появился как лекарственное средство с активностью против различных гематологических и солидных злокачественных образований, таких как миелодисплазия, множественная миелома, хронический лимфоцитарный лейкоз, первичный системный амилоидоз, не-ходжкинская лимфома, миелофиброз с миелоидной метаплазией и макроглобулинемия Вальденстрема (Venumadhav Kotla et al., 2009, Mechanism of action of Lenalidomide in hematological malignancies, *Journal of Hematology & Oncology*, 2: 36). Клинические данные для терапевтического потенциала леналидомида при различных злокачественных состояниях согласуются с большим числом фармакодинамических эффектов через различные механизмы при злокачественных заболеваниях крови, которые обнаружены *in vitro* и на животных моделях. Леналидомид может положительно регулировать ген- супрессор опухоли p21 и таким образом индуцировать апоптоз раковых клеток (Verhelle D. et al., 2007, Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Cancer Res.*, 67(2): 746-55). Также показано, что леналидомид существенно снижает экспрессию ангиогенных факторов VEGF и интерлейкина-6 (IL-6) при множественной миеломе, посредством этого снижая ангиогенез, и, следовательно, вносит вклад в активность клинического лечения при множественной миеломе (Gupta D. et al., 2001, Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*, 15(12): 1950-61).

Целью настоящего изобретения является связывание или конъюгация НА с вышеуказанным лекарственным средством, с линкером или спейсером или без них, с помощью карбоксильной группы, гидроксильной группы или аминогруппы НА для осуществления функционального воздействия в специфической области и на протяжении определенного времени. Следовательно, НА как носитель для направленной доставки для переноса лекарственного средства в специфическую область, в которой имеется множество CD44, может демонстрировать более хорошую эффективность и безопасность лечения.

Используемый в данном описании, в основном, термин "линкер" или "спейсер" обозначает органическую частицу, которая соединяет две части соединения. Линкеры обычно включают прямую связь или атом, такой как атом кислорода или серы, звено, такое как SS, NH, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH, или цепь из атомов, такую как замещенный или незамещенный алкил, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, NH, NH<sub>2</sub>, C(O). Термин "линкер" или "спейсер" в настоящем изобретении может отсутствовать и обозначать любое химическое соединение, присутствующее между лекарственным средством и НА, которое может быть удалено химически, ферментативно или может разлагаться спонтанно; он также содержит, по меньшей мере, одну другую группу, применимую для соединения лекарственного средства, например, амина, тиольную, другую карбоксильную группу и т.д. Линкер или спейсер может представлять собой полипептид, пептид или липид.

Подходящими линкерами или спейсерами являются, например, разветвленные, алифатические, ароматические или арилифатические дикарбоновые кислоты C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, аминокислоты, пептиды.

Роль линкера, когда он присутствует, состоит в создании плеча или спейсера между гиалуроновой кислотой и лекарственным средством. Линкер обеспечивает, с одной стороны, связь НА через амидную, карбоксильную группу, гидроксильную группу или аминогруппу и, с другой стороны, лекарственного средства через любую возможную связь ковалентного типа.

Когда линкер или спейсер представляет собой дикарбоновую кислоту, ее карбоксильная группа образует эфирную связь с группой лекарственного средства, которая может представлять собой гидроксильную группу. Когда линкер или спейсер представляет собой дигидразид, аминогруппа образует амидную связь с НА с группой, которая может представлять собой карбоксильную группу НА. Предпочтительными линкерами или спейсерами являются янтарная кислота для лекарственного средства и гидразид адипиновой кислоты (ADH) для НА.

Предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к конъюгату гиалуроновой кислоты и леналидомида, где функциональная группа леналидомида связана ковалентной связью непосредственно с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты или ее соли.

Активное-соединение леналидомид, может связываться, предпочтительно, непосредственно, посредством функциональной карбоксильной группы НА.

Предпочтительная НА для конъюгации имеет среднюю молекулярную массу в интервале, заключенном от 10 до 2000 кДа, и конъюгация вовлекает по меньшей мере 40% карбоксильных групп НА.

Конъюгаты по изобретению предпочтительно предназначены для применения для лечения раковых заболеваний и предпочтительно, в самом предпочтительном воплощении настоящего изобретения, раковые заболевания выбирают из рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы, рака толстой кишки, аденокарциномы, лимфомы и плоскоклеточного рака, рака молочной железы, дуктальных карцином, лобулярных карцином, рака легких, не-

мелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака почек, почечно-клеточного рака, переходно-клеточной карциномы, множественной миеломы, миелодиспластических синдромов (MDS), ходжкинской лимфомы, не-ходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза или карциномы поджелудочной железы.

Следовательно, настоящее изобретение относится к противораковым конъюгатам НА с леналидомидом, где функциональная группа леналидомида связана ковалентной связью непосредственно с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты или ее соли.

Для одного из воплощений настоящего изобретения показано, что в богатой CD44 клеточной линии (HT29) конъюгат НА-леналидомид обнаруживает значительно более сильное цитотоксическое действие, чем леналидомид или НА, соответственно (фиг. 4А); тем не менее, такое синергетическое действие не отмечено в клеточной линии НСТ 15 (фиг. 4В). Результат по настоящему изобретению показывает, что тенденция клеток в НСТ 15 с меньшим количеством CD44 к жизнеспособности выше, чем в HT29 со множеством CD44 при обработке НА-леналидомидом, что означает, что богатая CD44 клеточная линия HT29 более чувствительна к обработке НА-леналидомидом; однако действие леналидомида на жизнеспособность клеток почти одинаковое в обеих клеточных линиях. Такой результат показывает, что леналидомид не взаимодействует с CD44, и НА действительно может усилить эффективность терапии леналидомидом при конъюгации с ним при сравнении с таким же количеством лекарственного средства.

В итоге протвоопухолевая эффективность леналидомида, конъюгированного с НА, сравнима с леналидомидом самим по себе, однако существенно улучшено цитотоксическое действие и эффективность супрессии опухоли. Указанные выше результаты показывают, что настоящее изобретение вносит большой вклад в усиление лечебного действия противоракового лекарственного средства, включая леналидомид и нимесулид.

Для того, чтобы лечить от заболевания, предпочтительное в состав препарата или лекарственной формы по настоящему изобретению включают эксципиент для получения состава лекарственной формы для введения в глаза, уши, перорального, назального введения, введения в дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, кровотока или местного применения. Более предпочтительное воплощение пероральной лекарственной формы выбирают из группы, состоящей из твердой лекарственной формы, раствора, включая, но не ограничиваясь указанным, суспензию, таблетки, включая, но не ограничиваясь указанным, таблетку с регулируемым высвобождением, и капсулу, включая, но не ограничиваясь указанным, капсулу с энтеросолюбильным покрытием. Более предпочтительное воплощение формы для введения в желудочно-кишечный тракт выбирают из группы, состоящей из твердой лекарственной формы, перфузии, клизмы, суппозитория и раствора, включая, но не ограничиваясь указанным, суспензию. Более предпочтительное воплощение формы для введения в кровоток или системного введения выбирают из группы, состоящей из внутривенной (IV), внутримышечной (IM) и подкожной (SC) форм. Более предпочтительное воплощение формы для местного введения выбирают из группы, состоящей из перфузии, клизмы, суппозитория, спрея, ингаляции и капель.

Способ получения конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида также является объектом изобретения, и он включает стадии

- получения водного раствора гиалуроновой кислоты;
- получения водного раствора леналидомида с гидрохлоридом N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом;
- смешивания и перемешивания обоих растворов при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 ч для получения смешанного раствора и диализа смешанного раствора в течение нескольких дней.

Следующие далее примеры приводятся в целях пояснения различных воплощений изобретения и не означают какого-либо ограничения настоящего изобретения.

### Примеры

Пример 1. Адгезия НА к ткани толстой кишки (система получения изображения 3 IVIS)

#### Процедура

1. Добавляют 0,25 г порошка высокомолекулярного гиалуроната натрия (HHA; MW 2 МДа; Freda) и 0,25 г порошка низкомолекулярного гиалуроната натрия (LHA; MW 0,35 МДа; Freda) в 50 мл буфера PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) соответственно для образования 0,5% раствора и затем перемешивают в течение 6 ч, пока порошок полностью не растворится. Добавляют 0,25 г порошка среднемолекулярного гиалуроната натрия (MHA; MW 1 МДа; Freda) в 50 мл буфера PBS и затем перемешивают в течение 6 ч, пока порошок не растворится полностью и раствор станет готовым для использования на следующих стадиях.

2. Получают флуоресцентную НА (НА-f) следующим путем:

(1) растворяют 0,39 г свободной кислоты MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, Calbiochem) в 100 мл бидистиллированной воды.

(2) Раствор А: 65 мг порошка флуоресцеинамина (изомер I, Fluka) растворяют в 9 мл 95% раствора этанола (EtOH) и затем перемешивают в течение 10 мин в темноте.

(3) Раствор В: 359 мг порошка EDC (гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодимид, Sigma) растворяют в 9 мл буфера MES и затем перемешивают в течение 10 мин.

(4) Раствор С: 216 мг порошка NHS (N-гидроксисукцинимид, Sigma) растворяют в 9 мл буфера MES и затем перемешивают в течение 10 мин.

(5) Постепенно 3 мл раствора А добавляют по каплям к 50 мл 0,5% раствора НА и затем перемешивают в течение 10 мин в условиях, когда освещение запрещено.

(6) По отдельности 3 мл раствора В и 5 мл раствора С добавляют по каплям к раствору со стадии (5) и затем перемешивают в течение 10 мин в условиях, когда освещение запрещено.

(7) К раствору со стадии (6) постепенно добавляют 0,02 М буфер MES до тех пор, пока объем не достигнет 100 мл, и затем перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре в условиях, когда освещение запрещено.

(8) Продукт после реакции выливают в диализную трубку (MW 12000-14000) в 5 л деионизованной воды как раствор для диализа и затем перемешивают в течение 5 суток при 4°C в темноте, причем раствор для диализа заменяют каждые 12 ч до тех пор, пока в растворе для диализа не будет отсутствовать флуоресценция).

(9) Жидкость после диализа помещают в 50-см<sup>3</sup> пластиковые центрифужные пробирки и затем хранят при -20°C в холодильнике в течение ночи, после чего сушат в темноте в установке для сушки вымораживанием. (10) Сухой порошок НА-f хранят в холодильнике при -20°C.

(11) Постепенно добавляют 50 мг порошка НА-f в 10 мл буфера PBS и затем перемешивают в течение 6 ч, пока порошок полностью не растворится.

3. Ткань толстой кишки крысы SD (крыса Sprague-Dawley) в возрасте 7-8 недель нарезают скальпелем и затем промывают буфером PBS, затем нарезают длиной 3-4 см и окончательно замачивают в буфере PBS.

4. Поврежденную ткань толстой кишки получают путем легкого касания зубной щеткой в продольном направлении с последующим замачиванием в буфере PBS.

5. Нормальную и поврежденную ткани толстой кишки помещают в 12-луночный планшет и затем в каждую лунку добавляют 1 мл 0,5% раствора НА-f и встряхивают в течение 2 ч при комнатной температуре. Спустя 2 ч избыток раствора НА-f отсасывают наконечником и затем погружают в буфер PBS на 10 минут с последующим удалением буфера PBS, повторяя 3 раза.

6. Очищенную ткань толстой кишки помещают в 12-луночный планшет выстилкой ткани вверх и затем помещают на платформу IVIS (система получения изображения *in vivo*, XENOGEN). Параметр по умолчанию выставляют как GFP (зеленый флуоресцентный белок), в то время как длина волны возбуждения 465 нм и испускания 500 нм, и затем регистрируют изображение с помощью программы.

7. Все величины вычисляют как средние из наблюдений. Гистологический индекс анализируют с помощью t-критерия Стьюдента.

Результат:

Индекс флуоресценции количественно определяют и устанавливают, как показано на фиг. 1. Индекс флуоресценции нормальной ткани принимают за 1. Другие испытания с тканями толстой кишки калибруют по установленной величине. Результаты показывают, что НА с одной и той же средней Mw прилипают к поврежденным тканям толстой кишки, что видно по более высоким индексам флуоресценции, чем к нормальным тканям толстой кишки ( $P < 0,01$ ). При сравнении различия между НА с тремя различными средними молекулярными массами, адгезировавших на поврежденных тканях толстой кишки, видно, что измеряемый флуоресценцией индекс адгезии НА в 350 кДа к поврежденным тканям толстой кишки выше, чем у НА с двумя другими средними молекулярными массами (2 МДа и 1 МДа). Далее, измеряемый флуоресценцией индекс адгезии НА с 1 МДа даже к нормальным или поврежденным тканям выше, чем НА в 2 МДа.

Пример 2. Процесс конъюгации НА-краситель и получение изображения НА-краситель *in vitro*

Процедура:

Весь следующий далее процесс конъюгации НА-краситель должен выдерживаться в темноте.

#### Синтез НА-ADH

1. НА (0,34 МДа, 50 мг) растворяют в воде и получают концентрацию 4 мг/мл.

2. В раствор добавляют 5-кратный избыток (114,8 мг) ADH (гидразид адипиновой кислоты).

3. Доводят pH реакционной смеси до 4,75 путем добавления 0,1 N HCl.

4. Затем добавляют 1 экв. (25,1 мг) EDC в твердой форме. Поддерживают pH реакционной смеси 4,75 путем добавления 0,1 N HCl.

5. После 15-минутного взаимодействия реакцию гасят путем добавления 0,1 N раствора NaOH, доводя pH реакционной смеси до 7,0.

6. Затем реакционную смесь переносят в предварительно обработанную диализную трубку (порог Mw 3500) и проводят исчерпывающий диализ против 100 mM NaCl, затем 4 цикла против смеси 25% EtOH/вода и наконец воды. Затем раствор фильтруют через мембрану из ацетата целлюлозы, 0,2 мкм, флэш-замораживают и лиофилизируют.

7. Измеряют степень замещения ADH методом  $^1\text{H}$  ЯМР.

#### Синтез НА-ADH-FITC

1. Растворяют 88 мг НА-ADH (DS=36%) в 35 мл воды.
2. Растворяют 9,5 мг FITC в 10 мл ДМСО.
3. Смешивают раствор НА-ADH и раствор FITC.
4. После перемешивания в течение 48 ч при комнатной температуре раствор диализуют 3 суток с 0,3 М NaCl с чистой водой с использованием например диализного мешка MWCO 12000-14000.
5. Затем раствор сушат вымораживанием 2 суток.
6. Наконец, определяют степень замещения с помощью УФ-спектра.

#### Получение изображения НА-красителя in vitro

- (1) Высевают  $1 \times 10^5$  клеток HT 29 и HCT 15 (карцинома толстой кишки человека. CD44-положительные клетки) в чашке 3,5 см на предметном стекле микроскопа.
- (2) К клеткам добавляют указанные концентрации красителя, 1 мкМ НА-красителя (НА 0,34 МДа) соответственно в указанное время.
- (3) После инкубации клетки промывают в PBS и затем фиксируют в 3,7% формальдегиде.
- (4) Наблюдают за взаимодействием между НА-красителем и клетками с помощью конфокальной микроскопии.

Результат:

Наличие флуоресценции может показать место присоединения и количество красителя на HCT 15 (фиг. 2А и 2В) и HT29 (фиг. 2С и 2D). Результаты показывают, что краситель успешно конъюгирован с НА и НА увеличивает концентрацию НА-красителя в области множества CD44 на HT29, принимая во внимание, что HT29 имеет более интенсивную флуоресценцию, это согласуется с тем, что в них CD44 больше, чем в HCT 15. Даже оказывается, что НА-краситель может проникнуть в клетки (фиг. 2D). После 6 ч обработки НА-краситель может накапливаться и интернализироваться после 12 ч обработки в HT29 (больше CD44). Такое явление не наблюдается в HCT 15 (меньше CD44) после 6 или 12 ч обработки НА-красителем.

Пример 3. Клеточная линия и модель с ксенотрансплантатом опухоли

Процедура:

1. Условия культивирования клеток и пересев

(1) Условия культивирования клеток

(2) Пересев

(I) Удаляют и отбрасывают культуральную среду.

HT29: обогащенная глюкозой DMEM, 10% FBS, 1% пирувата натрия, 1% пенициллина, стрептомицина и неомицина.

HCT 15: DMEM/F12, 10% FBS, 1% пирувата натрия, 1% пенициллина, стрептомицина и неомицина.

(2) Пересев

(1) Удаляют и отбрасывают культуральную среду.

(II) Быстро промывают клеточный слой  $1 \times$  PBS для удаления всех следов сыворотки, которая содержит ингибитор трипсина.

(III) Добавляют в колбу 1 мл раствора 0,25% трипсина-ЭДТК и наблюдают за клетками в микроскоп до тех пор, пока клеточный слой не распадется (обычно 5-15 мин). Затем добавляют 9 мл полной среды для роста и отсасывают клетки осторожным пипетированием.

(IV) В новую чашку для культивирования добавляют соответствующие аликвоты клеточной суспензии (коэффициент субкультивирования 1:3-1:8).

(V) Культуры инкубируют в термостате при 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

2. Модель с ксенотрансплантатом опухоли

(1) Клетки HT29 и HCT 15 ( $2 \times 10^7$  клеток/мышь) инъецируют подкожно по отдельности в правые и левые бедра восьминедельных самцов голых мышей.

(2) Эксперимент с IVIS можно начинать проводить через 3-4 недели, когда размер ксенотрансплантатов опухолей станет 400-500 мм<sup>3</sup>.

3. Эксперимент с IVIS

(1) После анестезии изофлураном изображение голых мышей с ксенотрансплантатом можно принять за контроль в параметрах f/stop: 8, время экспозиции 3 с, длина волны возбуждения 633 или 635 нм, и измерения длины волны испускания 668 нм. Используемым прибором является Xenogen IVIS 200.

(2) В хвостовую вену инъецируют внутривенно соответственно 200 мкл 12,5 мкМ раствора свободного красителя или 200 мкл 12,5 мкМ раствора НА-красителя с 0,1 мг НА (НА1,12 МДа).

(3) Фотографии изображений IVIS получают в предварительно установленное время 5, 10, 30 мин и 1, 2 ч. Параметры наблюдения и прибор кратко описаны на стадии 1. Мышей умерщвляют с последующим препарированием через 2 ч после инъекции для анализа распределения картины флуоресценции во внутренних органах.

Результат:

Флуоресцентное изображение показывает, что свободный краситель распределяется почти равномерно в НТ29 (слева) и НСТ 15 (справа). Отношение площади присоединения НТ29 составляет 50,15%, в то время как НСТ 15 49,86%. Однако НА-краситель может, в частности, присоединиться в большей степени к области множества CD44 НТ29, чем к НСТ 15, которые имеют меньше CD44, чем НТ29. Отношение площади присоединения НТ29 составляет 74,15%, в то время как НСТ 15 25,85%. Результаты показывают, что НА может вносить вклад в накопление красителя в области множества CD44.

Пример 4. Синтез конъюгата НА-леналидомид

Процедура:

1. Растворяют 50 мг НА (10 кДа - 700 кДа) в 25 мл DD воды.
2. Смешивают 25,1 мг EDC и 15,1 мг NHS в 2 мл DD воды и перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин.
3. Нейтрализуют раствор НА, добавляя 1,31 мл раствора NaOH.
4. Растворяют 3,4 мг леналидомида в 2 мл раствора диметилсульфоксида (DMCO).
5. Такую смесь (НА, EDC, NHS и леналидомид) перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч.
6. Смесь диализуют в течение 2-3 суток против избытка DD воды с использованием мешка для диализа (MWCO 3500).
7. Получают порошок НА-леналидомида из раствора НА-леналидомида путем обезвоживания в сублимационной сушилке.

Результат:

На фиг. 3 показана структура конъюгата НА-леналидомид.

Пример 5. Цитотоксичность леналидомида *in vitro*

Процедура:

1. Клетки НТ29 высевают при низкой плотности  $1 \times 10$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты в среде, содержащей обогащенную глюкозой DMEM, 10% FBS, 1% пирувата натрия, 1% пенициллина, стрептомицина и неомицина.
2. Клетки НСТ 15 высевают при низкой плотности  $1 \times 10$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты в среде, содержащей DMEM/F12, 10% FBS, 1% пирувата натрия, 1% пенициллина, стрептомицина и неомицина.
3. Через сутки (24 ч) после посева клетки инкубируют в течение 24 ч в средах, содержащих указанные дозы лекарственных средств с леналидомидом: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 мкМ и 0; НА: 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,0625, 0,3125 мг/мл и 0; НА-леналидомид: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 мкМ и 0.
4. Действие лекарственных средств на жизнеспособность клеток оценивают с использованием анализа, основанного на расщеплении желтого красителя бромида 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ) до фиолетового кристаллического вещества формазана за счет активности дегидрогеназы в митохондриях.
5. После обработки лекарственным средством в течение 24 ч среду удаляют и клеточные слои промывают средой после разбавления в среде МТТ (0,5 мг/мл) в течение 4 ч в термостате при 37°C (5% CO<sub>2</sub>).
6. Затем к клеткам добавляют 100 мкл/лунка DMCO и измеряют оптическую плотность клеточного гомогената при 570 нм с использованием планшет-ридера для ELISA.
7. Фракцию живых клеток вычисляют путем деления средней оптической плотности, полученной для обработанных клеток, на среднюю оптическую плотность для необработанных контрольных клеток.

Результат:

Показано, что в обогащенной CD44 клеточной линии (НТ29) действием уничтожать клетки обладает конъюгат НА-леналидомид, а не один леналидомид или одна НА (фиг. 4А). Подобным образом, такая же тенденция к синергетическому действию обнаруживается в клеточной линии НСТ 15 (фиг. 4В).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида, где функциональная группа леналидомида связана ковалентной связью непосредственно с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты или ее соли.
2. Конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по п.1, при этом гиалуроновая кислота имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне 10-2000 кДа.
3. Применение конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида по одному из пп.1, 2 для получения фармацевтического препарата для лечения рака.
4. Применение конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида по п.3, при этом рак представляет собой рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, холангиокарциному, холангиоцеллюлярную цистаденокарциному, рак толстой кишки, аденокарциному, лимфому и плоскоклеточный рак, рак молочной железы, дуктальные карциномы, лобулярные карциномы, рак легких, немелкоклеточный рак легких, мелко-

клеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточный рак, переходно-клеточную карциному, множественную миелому, миелодиспластические синдромы (MDS), ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз или карциному поджелудочной железы.

5. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по одному из пп. 1, 2 в комбинации с по меньшей мере одним эксципиентом и/или разбавителем.

6. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по п.5, которая является композицией для лечения рака.

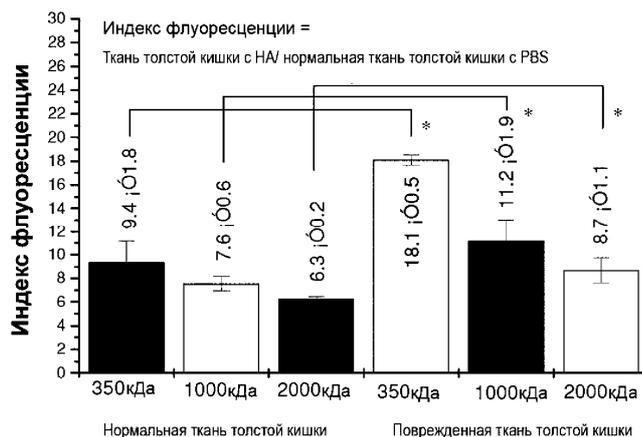
7. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один конъюгат гиалуроновой кислоты и леналидомида по п.6, при этом рак представляет собой рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, холангиокарциному, холангиоцеллюлярную цистаденокарциному, рак толстой кишки, аденокарциному, лимфому и плоскоклеточный рак, рак молочной железы, дуктальные карциномы, лобулярные карциномы, рак легких, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточный рак, переходно-клеточную карциному, множественную миелому, миелодиспластические синдромы (MDS), ходжкинскую лимфому, не-ходжкинскую лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз или карциному поджелудочной железы.

8. Способ получения конъюгата гиалуроновой кислоты и леналидомида по п. 1, включающий стадии получения водного раствора гиалуроновой кислоты, с гидрохлоридом N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимидом;

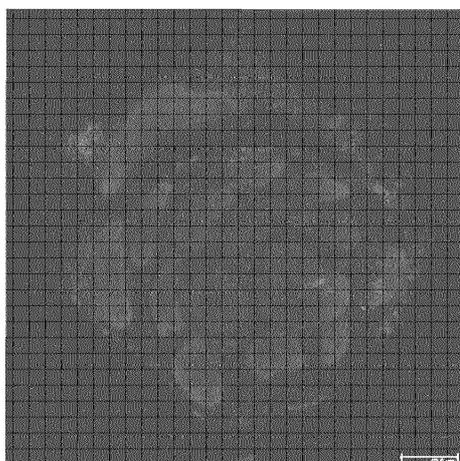
получения раствора леналидомида;

смешивания и перемешивания обоих растворов при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 ч для получения смешанного раствора и

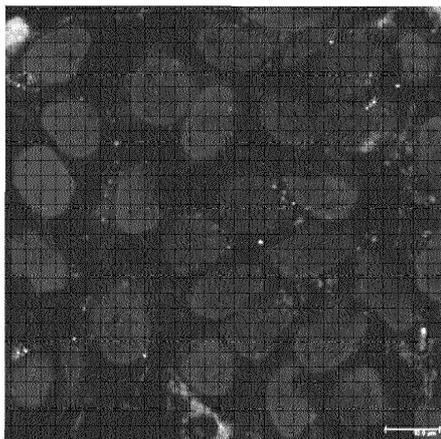
диализа смешанного раствора в течение нескольких дней.



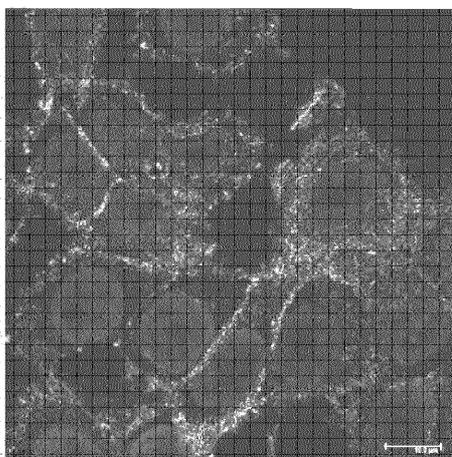
Фиг. 1



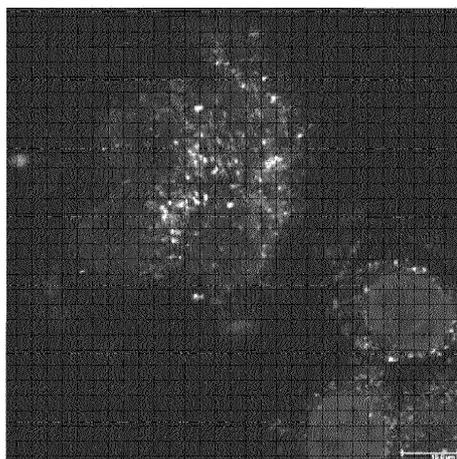
Фиг. 2А



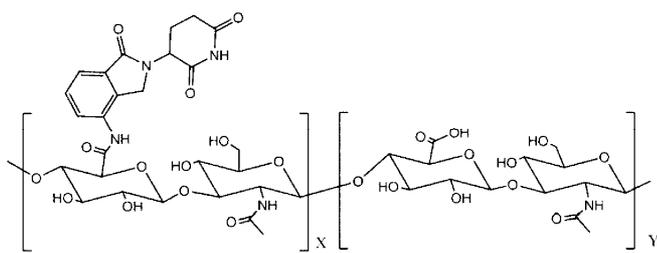
Фиг. 2В



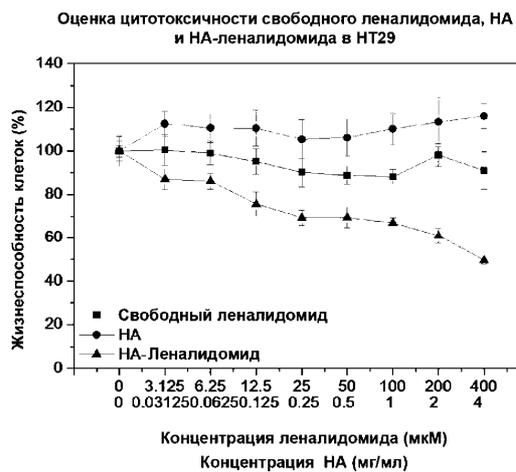
Фиг. 2С



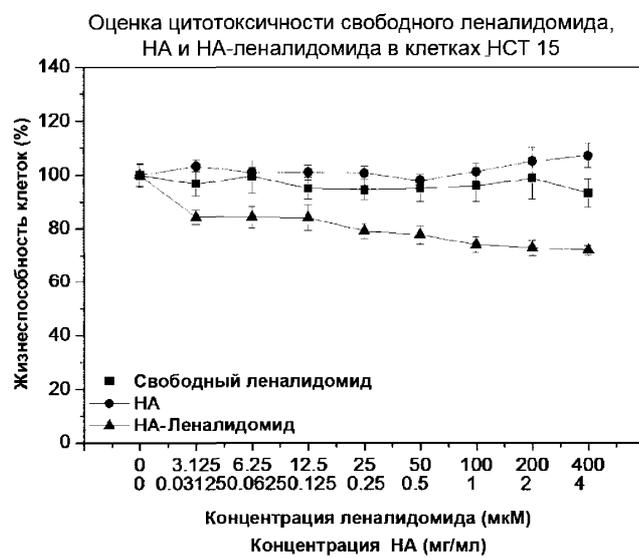
Фиг. 2D



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В

