

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041072**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.08

(21) Номер заявки
201991924

(22) Дата подачи заявки
2018.02.22

(51) Int. Cl. **A61K 47/60** (2017.01)
C08G 69/10 (2006.01)
C08G 69/40 (2006.01)
C08G 83/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ДЕНДРИМЕРЫ

(31) **62/461,983; 62/488,151; 62/591,823**

(32) **2017.02.22; 2017.04.21; 2017.11.29**

(33) **US**

(43) **2020.02.20**

(86) **PCT/EP2018/054420**

(87) **WO 2018/154004 2018.08.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
**Маккоулл Уилльям, Эшфорд
Мэриэнн Бернис, Грант Иэн (GB),
Хэннесси Эдвард Джон, Секрист Джон
Пол (US), Оуэн Дэвид, Келли Брайен,
Джианнис Майкл (AU)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) **US-A1-2012035134
WO-A1-2015035446**

**SUNIL KUMAR PARAJAPATI ET AL.:
"POTENTIAL APPLICATION OF DENDRIMERS
IN DRUG DELIVERY: A CONCISE REVIEW
AND UPDATE", JOURNAL OF DRUG DELIVERY
AND THERAPEUTICS, vol. 6, no. 2, 15
March 2016 (2016-03-15), XP055466095, DOI:
10.22270/jddt.v6i2.1195, table 1**

**TADEUSZ ROBAK: "BCL-2 inhibitors
for Chronic Lymphocytic Leukemia", JOURNAL
OF LEUKEMIA, vol. 03, no. 03, 1
January 2015 (2015-01-01), XP055466113, DOI:
10.4172/2329-69170.100e114, paragraphs dealing
with navitoclax, venetoclax and obatoclax on page 1-2**

**J. DENG ET AL.: "Bruton's tyrosine kinase
inhibition increases BCL-2 dependence and enhances
sensitivity to venetoclax in chronic lymphocytic
leukemia", LEUKEMIA, vol. 31, no. 10, 23 January
2017 (2017-01-23), pages 2075-2084, XP055466121,
US, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2017.32,
abstract**

(57) Раскрыт дендример формулы (III)

D-ядро-D (III),

или его фармацевтически приемлемая соль. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие дендример формулы (III), и применение указанных дендримеров для лечения рака.

B1**041072****041072 B1**

Предпосылки изобретения

Bcl-2 и Bcl-XL являются важными антиапоптозными представителями семейства белков Bcl-2 и главными регуляторами выживания клеток (Chipuk J.E. et al., The Bcl-2 family reunion, *Mol. Cell*, 2010 Feb, 12; 37(3):299-310). Транслокация, амплификация генов и/или сверхэкспрессия белков этих критических для выживания факторов была обнаружена у нескольких типов рака, и они широко вовлечены в развитие и прогрессирование рака. (Yip et al., Bcl-2 family proteins and cancer, *Oncogene*, 2008, 27, 6398-6406 и Beroukhi R. et al., The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature*, 2010 Feb, 18; 463 (7283):899-905). Также было показано, что при многих злокачественных новообразованиях Bcl-2 и/или Bcl-XL опосредуют лекарственную устойчивость и рецидив, и их убедительно ассоциируют с плохим прогнозом (Robertson L.E. et al., Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome, *Leukemia*, 1996 Mar; 10(3):456-459 и Ilievska Poposka B. et al., Bcl-2 as a prognostic factor for survival in small-cell lung cancer, *Makedonska Akademija na Naukite i Umetnostite Oddelenie Za Bioloshki i Meditsinski Nauki Prilozi*, 2008 Dec; 29(2):281-293).

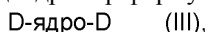
Антиапоптозные белки семейства Bcl-2 способствуют выживанию раковых клеток за счет связывания с проапоптозными белками, такими как BIM, PUMA, BAK и BAX, и нейтрализации их активности, индуцирующей клеточную гибель (Chipuk J.E. et al., ниже; and Yip et al., ниже). Следовательно, терапевтическое целенаправленное воздействие на Bcl-2 и Bcl-XL отдельно или в комбинации с другими видами терапии, влияющими на главные белки семейства Bcl-2, такими как цитотоксические химиотерапевтические средства, ингибиторы протеасом или ингибиторы киназ, является привлекательной стратегией, с помощью которой можно лечить рак и можно преодолевать лекарственную устойчивость при многих типах рака человека (Delbridge, A.R.D. et al., The Bcl-2 protein family, Bcl-2 mimetics and cancer therapy, *Cell Death & Differentiation*, 2015 22, 1071-1080).

Кроме активности в отношении клеток, чтобы соединение-кандидат стало подходящим приемлемым лекарственным продуктом, соединение должно обладать множеством дополнительных свойств и проявлять их. Это подразумевает подходящие физико-химические свойства, которые обеспечивают возможность составления в соответствующую лекарственную форму (например, растворимость, стабильность, технологичность), подходящие биофармацевтические свойства (например, проникающая способность, растворимость, всасывание, биодоступность, стабильность в биологических условиях, фармакокинетическое и фармакодинамическое поведение) и подходящий профиль безопасности для обеспечения приемлемого терапевтического индекса. Идентификация соединений, например ингибиторов Bcl-2 и/или Bcl-XL, которые проявляют некоторые или все такие свойства, является сложной задачей.

Конкретные ингибиторы Bcl-2 и/или Bcl-XL на основе N-ацилсульфонамида и способы их получения раскрыты в патенте США № 9018381. Активность и специфичность соединений, которые связываются с Bcl-2 и ингибируют его функцию в клетках, также были раскрыты в патенте США № 9018381 посредством анализа связывания *in vitro* и клеточного анализа. Однако доставка этих ингибиторов Bcl-2 и/или Bcl-XL на основе N-ацилсульфонамида оказалась сложной, например, вследствие их низкой растворимости и побочных эффектов, связанных с мишенью. Таким образом, заявители разработали дендримеры, связанные с определенными ингибиторами Bcl, которые могут преодолеть проблемы с доставкой, с которыми сталкиваются при применении неконъюгированных ингибиторов Bcl.

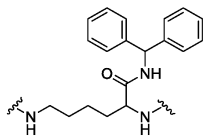
Краткое описание

В настоящем изобретении предложен дендример формулы (III)

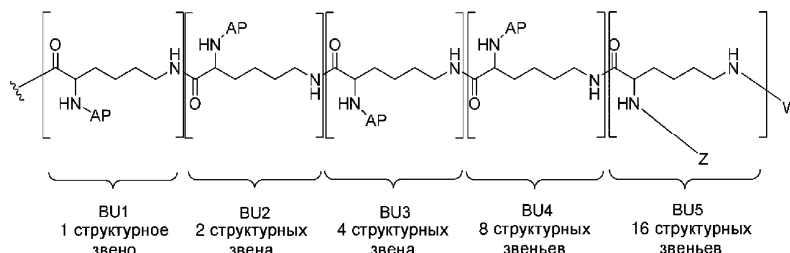


или его фармацевтически приемлемая соль,

где ядро представляет собой:



D представляет собой:



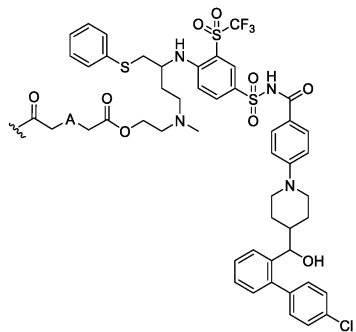
AP представляет собой точку прикрепления к другому структурному звену;

W независимо представляет собой (PM)_c или (H)_c;

Z независимо представляет собой (L-AA)_d или (H)_c;

PM представляет собой PEG900-1200 или PEG1800-2400;

L-AA представляет собой линкер, присоединенный ковалентной связью к активному средству; где L-AA представлен формулой



где A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S- или -CH₂-;

при условии, что если (c+d)<64, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой (H)_e, где e составляет 64-(c+d); а d составляет ≥1.

В одном воплощении в дендримере формулы (III) PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 2000 до приблизительно 2200 Да, в частности приблизительно 2150 Да.

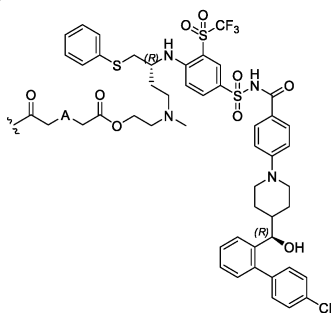
В одном воплощении c составляет целое число от 25 до 32, в частности целое число от 29 до 32, в частности 29 или 30.

В одном воплощении d составляет целое число от 25 до 32, в частности целое число от 29 до 32, в частности 32.

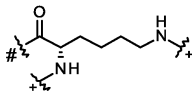
В одном воплощении (c+d) равняется целому числу от 50 до 64, в частности от 58 до 64.

В одном воплощении e составляет целое число от 0 до 14, в частности целое число от 0 до 6.

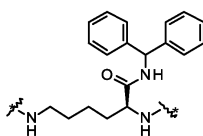
В одном воплощении L-AA представляет собой:



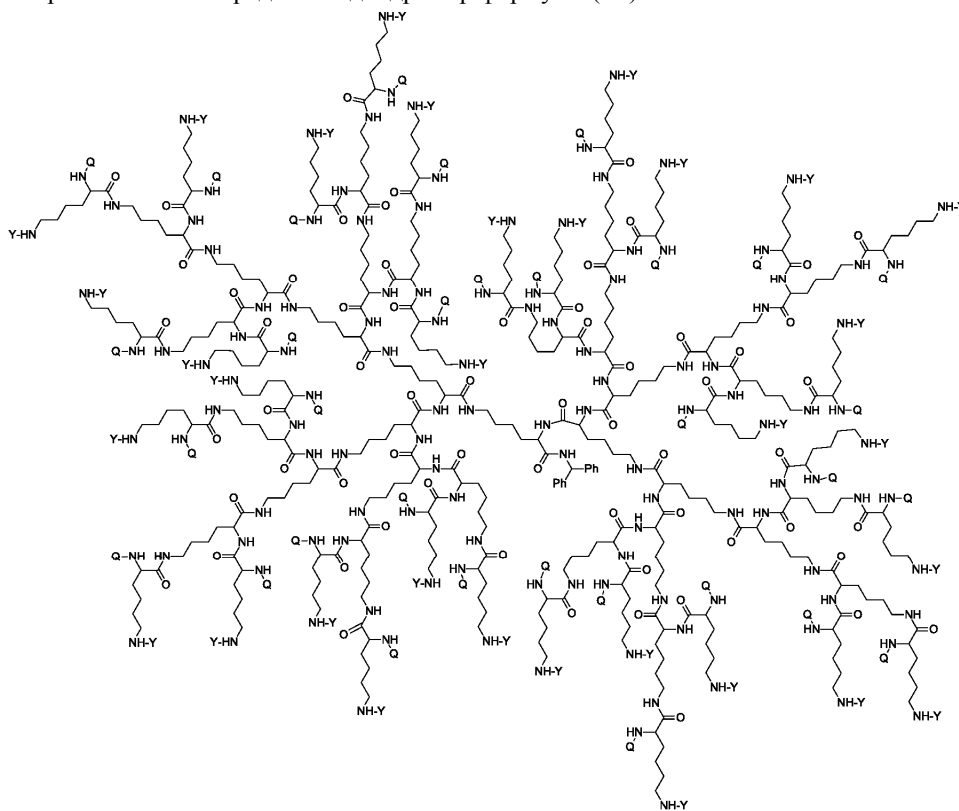
В одном воплощении BU представляет собой:



В одном воплощении ядро представляет собой:



В изобретении также предложен дендимер формулы (IV)

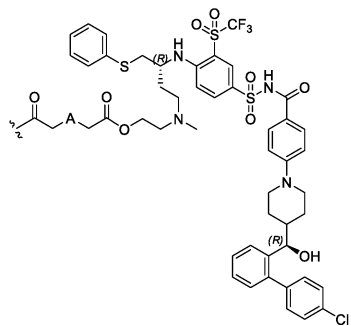


(IV),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;

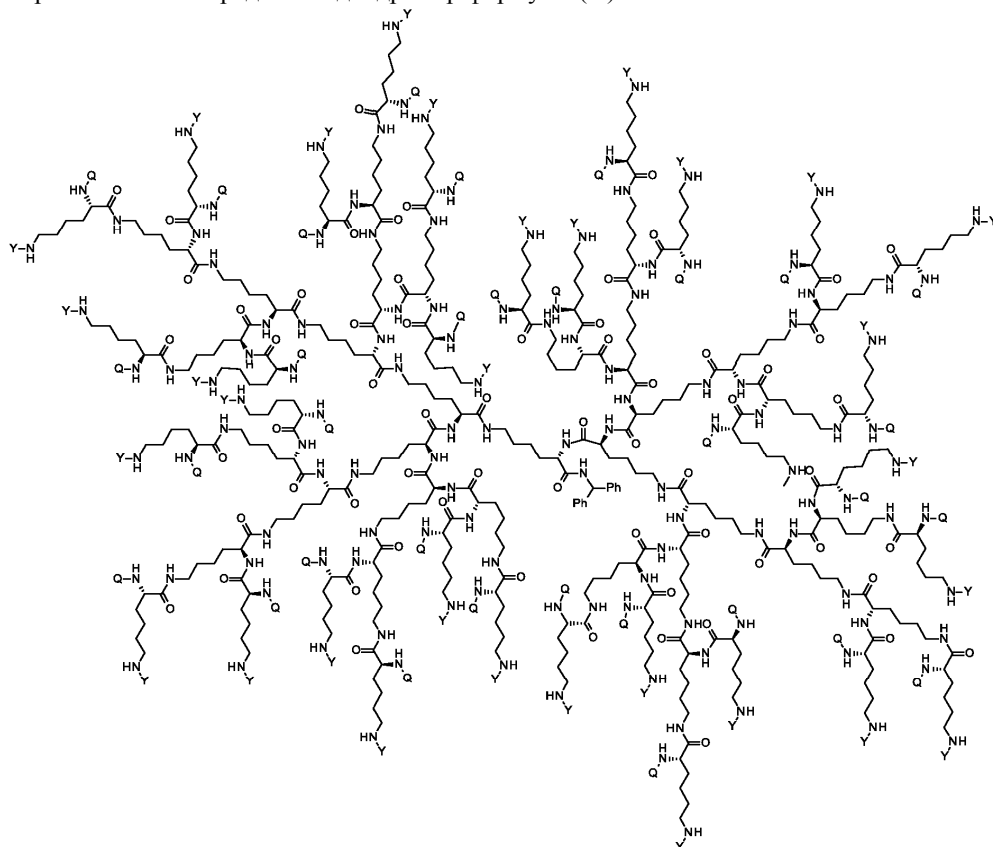
Q представляет собой H или L-AA, в котором L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),

при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.

В изобретении также предложен дендример формулы (V)

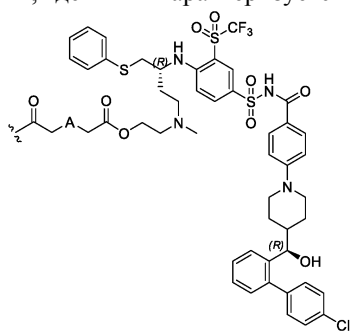


(V),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;

Q представляет собой H или L-AA, где L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),

при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.

В одном воплощении в дендримере формул (IV) и (V) сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет целое число от 50 до 64, в частности целое число от 58 до 64.

В одном воплощении дендример формул (IV) и (V) содержит от 25 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀, в частности от 29 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В одном воплощении дендример формул (IV) и (V) содержит от 25 до 32 L-AA, в частности от 29 до 32 L-AA.

В одном воплощении дендример формул (IV) и (V) содержит от 0 до 14 атомов водорода в положениях Q и/или Y, в частности от 0 до 6 атомов водорода в положениях Q и/или Y.

В одном воплощении в дендримере формул (IV) и (V) PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 2000 до 2200 Да.

Еще в одном воплощении в дендримере формул (IV) и (V) PEG характеризуется PDI от приблизительно 1,00 до 1,10, в частности PDI приблизительно 1,05.

В одном воплощении дендример формул (III), (IV) и (V) характеризуется молекулярной массой от приблизительно 90 до 120 кДа, в частности от приблизительно 103 до 107 кДа.

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие дендример формул (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

Также предложен способ лечения рака, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера формул (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

Также предложено применение дендримера формул (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака и применение дендримера формул (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображен дендример 3-го поколения.

Фиг. 2 представляет собой дифрактограмму XRPD для формы В соединения А.

На фиг. 3А показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у мышей SCID с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11) в случае применения составов соединения А, указанных в примере 2. Показана оценка эффективности соединения А, составленного с каждым из HP- β -CD (V1), Captisol (V2) и Tween (V3), в сравнении с соответствующими средами-носителями; среда-носитель 1 (V1, 30% HP- β -CD, pH 4), среда-носитель 2 (V2, 10,6% Captisol, pH 9) и среда-носитель 3 (V3, 0,5% Tween, pH 9).

На фиг. 3В показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у мышей SCID с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11) в случае применения составов соединения А с Cremophor. Показана оценка эффективности соединения А, составленного с Cremophor (V4), в сравнении с соответствующей средой-носителем; среда-носитель 4 (V4, 5% вес./об. Cremophor EL, pH 4). См. пример 2.

На фиг. 4 показана клеточная гибель (апоптоз) через 6 и 24 ч после введения однократной дозы соединения А, составленного с каждым из HP- β -CD (V1), Captisol (V2) и Tween (V3), в сравнении с соответствующими средами-носителями; среда-носитель 1 (V1, 30% HP- β -CD, pH 4), среда-носитель 2 (V2, 10,6% Captisol, pH 9) и среда-носитель 3 (V3, 0,5% Tween, pH 9). Ответ в виде показателя расщепления каспазы 3 (CC3) применяли в качестве количественного показателя клеточной гибели и определяли с применением набора для ELISA, Pathscan от Cell Signaling. См. пример 2.

На фиг. 5 показано воздействие на опухоль однократной дозы соединения А, составленного с каждым из HP- β -CD (V1), Captisol (V2) и Tween (V3). Концентрации соединения А в опухоли через 6 и 24 ч после введения однократной дозы определяли с применением LC-MS/MS. См. пример 2.

На фиг. 6 показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у крыс Rag2-/- с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11). Когда опухоли выросли примерно до 4500-6000 мм³, крыс рандомизировали на группу введения однократной IV инфузии среды-носителя 1 (30% HP- β -CD, pH 4) или 5 мг/кг соединения А в течение 30 мин. Показана оценка эффективности соединения А, составленного с 30% HP- β -CD (V1), в сравнении с соответствующей средой-носителем (V1). См. пример 2.

На фиг. 7 показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у крыс Rag2-/- с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11). Когда опухоли выросли примерно до 4500-6000 мм³, крыс рандомизировали в группы введения однократной IV инфузии среды-носителя 1 (30% HP- β -CD, pH 4) или 5 мг/кг соединения А, 3 мг/кг соединения А и 1 мг/кг соединения А в течение 30 мин. Показана оценка эффективности дозозависимого ответа на соединение А, составленное с 30% HP- β -CD (V1), при введении 5, 3 и 1 мг/кг в сравнении с соответствующей средой-носителем (V1). См. пример 2.

На фиг. 8 представлено сравнение скорости начального высвобождения молекул из примеров 6 и 9 во всем диапазоне значений pH. См. пример 13.

На фиг. 9 показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у мышей SCID с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11) в случае применения различных макромолекул по настоящему изобретению. Показана оценка эффективности среды-носителя (забуференный фосфатом физиологический раствор), соединения А (составленного в 30% HP- β -CD, pH 4), молекулы из примера 6 в PBS (эквивалент 10 и 30 мг/кг соединения А), молекулы из примера 9 в PBS (эквивалент 10 мг/кг соединения А). См. пример 18.

На фиг. 10 показана клеточная гибель (апоптоз) в различные моменты времени после введения однократной дозы либо среды-носителя (забуференный фосфатом физиологический раствор), либо молекулы из примера 6 в PBS (эквивалент 10 и 30 мг/кг соединения А). Ответ в виде показателя расщепления каспазы 3 (CC3) применяли в качестве количественного показателя клеточной гибели и определяли с применением набора для ELISA, Pathscan от Cell Signaling. См. пример 18.

На фиг. 11 показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у мышей SCID с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11) в случае применения различных раскрытых дендримеров. Показана оценка эффективности среды-носителя (забуференный

фосфатом физиологический раствор), состава на основе соединения А в среде-носителе 1 (30% HP-β-CD), молекулы из примера 6 в PBS (эквивалент 20 мг/кг соединения А) и молекулы из примера 9 в PBS (эквивалент 20 мг/кг соединения А). См. пример 18.

На фиг. 12 показана клеточная гибель (апоптоз) в различные моменты времени после введения однократной дозы среды-носителя (забуференного фосфатом физиологического раствора), составов на основе соединения А в среде-носителе 1 (30% HP-β-CD) из расчета 5 мг/кг и 10 мг/кг и дендримера из примера 9 в PBS в эквиваленте 10 мг/кг соединения А. Ответ в виде показателя расщепленной поли-АДФ-рибоза-полимеразы (PARP) применяли в качестве количественного показателя клеточной гибели. См. пример 18.

На фиг. 13 показаны данные для молекул из примеров 5, 7 и 8, вводимых дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А мышинной модели с ксенотрансплантатом RS4:11. Данные демонстрируют, что молекула из примера 7, вводимая дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А, индуцирует регрессию опухоли, в то же время молекулы из примеров 5 и 8, вводимые дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А, не продемонстрировали значимой противоопухолевой активности. См. пример 18.

На фиг. 14 показана ксенотрансплантатная модель острого лимфобластного лейкоза (ALL) у крыс Rag2-/- с применением клеток острого лимфобластного лейкоза человека (RS4:11) в случае применения молекулы из примера 6 и среды-носителя. Показана оценка эффективности среды-носителя (забуференного фосфатом физиологического раствора, PBS) и молекулы из примера 6 в PBS (эквивалент 10 мг/кг и 30 мг/кг соединения А). См. пример 18.

На фиг. 15 показана модель с ксенотрансплантатом SuDHL-4 у мышей SCID в случае применения среды-носителя (забуференного фосфатом физиологического раствора, PBS), молекулы из примера 6 в PBS (эквивалентной 50 мг/кг соединения А), молекулы из примера 9 в PBS (эквивалентной 50 мг/кг соединения А), ритуксимаба (10 мг/кг), комбинации молекулы из примера 6 (в эквиваленте 10, 30 и 50 мг/кг соединения А) с ритуксимабом (10 мг/кг) и комбинации молекулы из примера 9 (в эквиваленте 10, 30 и 50 мг/кг соединения А) с ритуксимабом (10 мг/кг). См. пример 18.

На фиг. 16 показан дендример формулы (IV).

На фиг. 17 показан дендример формулы (V).

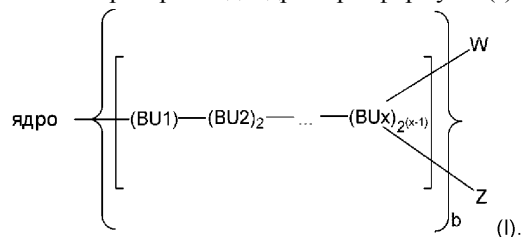
На фиг. 18 на модели опухоли мелкоклеточного рака легкого человека проиллюстрирована *in vivo* противоопухолевая активность, проявляемая молекулой из примера 9 в комбинации с ингибитором mTOR AZD2014.

На фиг. 19 на модели опухоли DLBcl человека проиллюстрирована *in vivo* противоопухолевая активность, проявляемая молекулой из примера 9 в комбинации с акалабрутинибом.

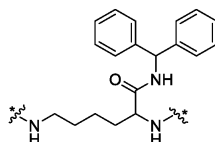
Подробное описание

В одном варианте осуществления раскрыты дендримеры, содержащие двухвалентное бензгидрил-гексанамидлизиновое ядро, структурные звенья в виде лизина, и при этом поверхностные функциональные группы замещены ингибитором Bcl и PEG.

В одном варианте осуществления раскрыты дендримеры формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль,
где ядро представляет собой:

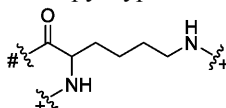


* обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом (BU1);

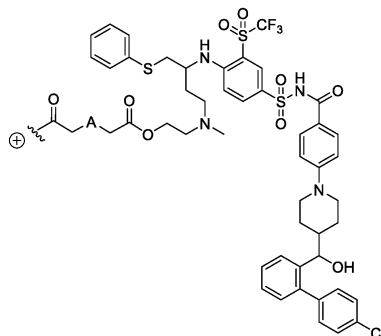
b составляет 2;

BU представляют собой структурные звенья;

BU_x представляют собой структурные звенья поколения x, где общее число структурных звеньев в поколении x дендримера формулы (I) равняется 2^x, а общее число BU в дендримере формулы (I) равняется (2^x-1)b; где BU характеризуется следующей структурой:



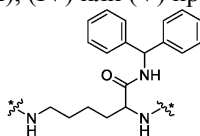
обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом ядра или аминфрагментом BU;
 + обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом BU или ковалентную связь с W или Z;
 W независимо представляет собой (PM)_e или (H)_e;
 Z независимо представляет собой (L-AA)_d или (H)_e;
 PM представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀ или PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀;
 L-AA представляет собой линкер, присоединенный ковалентной связью к активному средству; где L-AA представлен формулой



где A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S- или -CH₂-;
 ⊕ представляет собой точку прикрепления к аминному фрагменту BU_x;
 при условии, что (c+d) ≤ (2^x)b, a, d составляет ≥ 1; и
 при условии, что если (c+d) ≤ (2^x)b, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой (H)_e, где e составляет [(2^x)b] - (c+d).

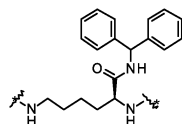
Исключительно с целью иллюстрации на фиг. 1 изображен дендример 3-го поколения, содержащий ядро, 3-го поколения структурных звеньев (BU) и 24 поверхностные функциональные группы.

Следует принимать во внимание, что ядро дендримера является центральным звеном, из которого строится дендример. В связи с этим ядро представляет собой центральное звено, из которого "вырастают" первое и последующие поколения структурных звеньев. В одном варианте осуществления ядро в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) представляет собой:



где * обозначает ковалентную связь со структурными звеньями дендримера.

В некоторых вариантах осуществления ядро в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) представляет собой:



где * обозначает ковалентную связь со структурными звеньями дендримера.

Термин "структурное звено" или "BU" предусматривает молекулы, имеющие по меньшей мере три функциональные группы, одну для прикрепления к ядру или структурному звену предыдущего поколения (или слоя) структурных звеньев или две или более функциональные группы для прикрепления к структурным звеньям следующего поколения (или слоя) структурных звеньев. Структурные звенья используются для построения слоев дендримера за счет добавления к ядру или предыдущему слою структурных звеньев. В некоторых вариантах осуществления структурные звенья имеют три функциональные группы.

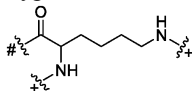
Термин "поколение" предусматривает число слоев структурных звеньев, которые составляют дендрон или дендример. Например, дендример первого поколения будет иметь один слой структурных звеньев, присоединенных к ядру, например ядро-[структурное звено]b, где b представляет собой число дендронов, присоединенных к ядру, и валентность ядра. Дендример второго поколения имеет два слоя структурных звеньев в каждом дендроне, присоединенном к ядру. Например, если структурное звено имеет одну двухвалентную точку ветвления, дендример может представлять собой ядро-[[структурное звено][структурное звено]2]b, дендример третьего поколения имеет три слоя структурных звеньев в каждом дендроне, присоединенном к ядру, например ядро-[[структурное звено][структурное звено]2[структурное звено]4]b, дендример пятого поколения имеет пять слоев структурных звеньев в каждом дендроне, присоединенном к ядру, например ядро-[[структурное звено][структурное звено]2[структурное звено]4[структурное звено]8[структурное звено]16]b, дендример шестого поколения имеет шесть слоев структурных звеньев, присоединенных к ядру, например ядро-[[структурное звено][структурное звено]2[структурное звено]4[структурное звено]8[структурное звено]16[структурное звено]32]b.

но]2[структурное звено]4[структурное звено]8[структурное звено]16[структурное звено]32]b и т.д. Последнее поколение структурных звеньев (самое удаленное от центра поколение) обеспечивает поверхностную функционализацию дендримера и число поверхностных функциональных групп, доступных для связывания группы, осуществляющей фармакокинетическую модификацию (РМ), и/или линкера и активного средства (L-AA).

Термин "поверхностные функциональные группы" относится к не вступившим в реакцию функциональным группам, которые находятся на последнем поколении структурных звеньев. В некоторых вариантах осуществления число поверхностных функциональных групп равняется $(2^x)b$, при этом x представляет собой число поколений в дендримере, а b представляет собой число дендронов. В некоторых вариантах осуществления поверхностные функциональные группы представляют собой функциональные первичные аминогруппы.

Общее число структурных звеньев в дендримере со структурными звеньями, имеющими три функциональные группы (например, одну точку ветвления), равняется $(2^x-1)b$, где x равняется числу поколений, а b равняется числу дендронов. Например, в дендримере, имеющем ядро с двумя присоединенными дендронами ($b=2$), если каждое структурное звено имеет одну точку ветвления и имеется пять поколений, будет 62 структурных звена и самое удаленное от центра поколение будет содержать 16 структурных звеньев с 64 поверхностными функциональными группами. В некоторых вариантах осуществления поверхностные функциональные группы представляют собой аминные фрагменты, например первичные или вторичные амины. В некоторых вариантах осуществления дендример представляет собой дендример пятого поколения, имеющий двухвалентное ядро, 62 структурных звена и 64 функциональные первичные аминогруппы.

В некоторых вариантах осуществления структурные звенья в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) характеризуются структурой

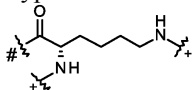


в которой # обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом ядра или аминфрагментом структурного звена;

+ обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом структурного звена или ковалентную связь с группой, осуществляющей фармакокинетическую модификацию, линкером, присоединенным к активному средству, или водородом.

В некоторых вариантах осуществления дендример содержит 62 структурных звена с 64 функциональными первичными аминогруппами.

В некоторых вариантах осуществления структурные звенья в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) характеризуются структурой



в которой # обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом ядра или аминфрагментом структурного звена;

+ обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом структурного звена или ковалентную связь с группой, осуществляющей фармакокинетическую модификацию, линкером, присоединенным к активному средству, или водородом.

Термин "группа, осуществляющая фармакокинетическую модификацию" или "РМ" предусматривает фрагменты, которые могут модифицировать или модулировать фармакокинетический профиль дендримера или активного средства, которое он доставляет. В некоторых вариантах осуществления РМ может модулировать распределение, метаболизм и/или экскрецию дендримера или активного средства. В некоторых вариантах осуществления РМ может влиять на скорость высвобождения активного средства, либо замедляя, либо увеличивая скорость, с которой активное средство высвобождается из дендримера за счет путей либо химического (например, гидролиза), либо ферментативного разложения. В некоторых вариантах осуществления РМ может изменять профиль растворимости дендримера, либо увеличивая, либо уменьшая растворимость в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления РМ может содействовать дендримеру в доставке активного средства в конкретную ткань (например, в опухоли).

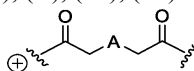
В некоторых вариантах осуществления в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) РМ представляет собой полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоль (PEG) характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 220 до приблизительно 5500 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 500 до приблизительно 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 2500 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 1500 до приблизительно

но 2400 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется молекулярной массой от приблизительно 900 до приблизительно 1200 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется молекулярной массой от приблизительно 1800 до приблизительно 2400 Да. В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется средней молекулярной массой приблизительно 2150 Да. Специалист в данной области сразу поймет, что термин "PEG₉₀₀₋₁₂₀₀" предусматривает PEG со средней молекулярной массой от приблизительно 900 до приблизительно 1200 Да, а термин "PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀" предусматривает PEG со средней молекулярной массой от приблизительно 1800 до приблизительно 2400 Да.

В некоторых вариантах осуществления PEG характеризуется коэффициентом полидисперсности (PDI) от приблизительно 1,00 до приблизительно 2,00, от приблизительно 1,00 до 1,50, например, от приблизительно 1,00 до приблизительно 1,25, от приблизительно 1,00 до приблизительно 1,10 или от приблизительно 1,00 до приблизительно 1,10. В некоторых вариантах осуществления PDI у PEG составляет приблизительно 1,05. Термин "коэффициент полидисперсности" относится к количественному показателю распределения молекулярной массы в данном образце полимера. PDI равняется средневзвешенной молекулярной массе (M_w), деленной на среднечисловую молекулярную массу (M_n), и обозначает распределение индивидуальных молекулярных масс в партии полимеров. PDI характеризуется значением, которое больше или равно 1, но в случаях, когда полимер приближается к однородной длине цепи и средней молекулярной массе, PDI будет ближе к 1.

В некоторых вариантах осуществления дендример содержит менее $(2^x)^b$ групп PEG, где x представляет собой число поколений дендримера, а b представляет собой число дендронов. В некоторых вариантах осуществления все поверхностные функциональные группы присоединены ковалентной связью к группам PEG. В некоторых вариантах осуществления, когда x составляет 5, дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 60 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит не более 2^x групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит 2^x групп PEG. Например, если структурное звено дендримера содержит одну двухвалентную точку ветвления, дендример второго поколения будет содержать не более 4 групп PEG, дендример третьего поколения будет содержать не более 8 групп PEG, дендример четвертого поколения будет содержать не более 16 групп PEG, дендример пятого поколения будет содержать не более 32 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит менее 2^x групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 64 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 40 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит не более 32 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 32 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 28 до приблизительно 32 групп PEG. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит 29 групп PEG, 30 групп PEG, 31 группу PEG или 32 группы PEG.

Раскрытые дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) включают линкер, прикрепленный ковалентной связью к активному средству (L-AA), при этом линкер (L) присоединен ковалентной связью к поверхностным функциональным группам последнего поколения структурных звеньев на одном конце линкера и к активному средству (AA) на другом конце линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) характеризуется структурой:

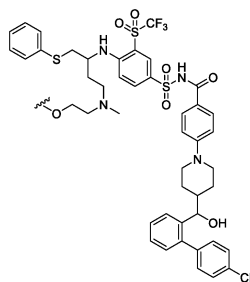


в которой $\oplus$ представляет собой ковалентную связь с функциональными аминогруппами на последнем поколении структурных звеньев;

представляет собой точку ковалентной связи с активным средством (AA), а A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S-или -CH₂-.

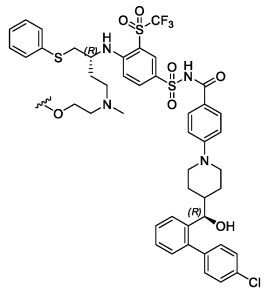
В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -N(CH₃).

В некоторых вариантах осуществления AA представляет собой ингибитор Bcl. В некоторых вариантах осуществления AA представляет собой ингибитор Bcl-2 и/или Bcl-XL. В некоторых вариантах осуществления AA представляет собой ингибитор Bcl-2 и/или Bcl-XL, раскрытый в патенте США № 9018381. В некоторых вариантах осуществления AA в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) характеризуется структурой:

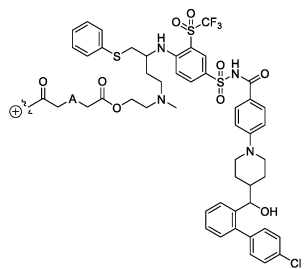


в которой  представляет собой точку ковалентной связи с линкером.

В некоторых вариантах осуществления AA в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) характеризуется структурой:



В некоторых вариантах осуществления структура L-AA в любом из дендримеров (I), (II), (III), (IV) или (V) представляет собой:

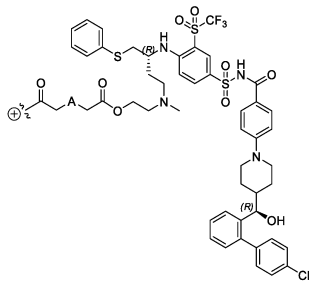


в которой $\oplus$ представляет собой ковалентную связь с функциональными аминогруппами на последнем поколении структурных звеньев;

A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S-или -CH₂-.

В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -N(CH₃).

В некоторых вариантах осуществления структура L-AA в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) представляет собой:



в которой $\oplus$ представляет собой ковалентную связь с функциональными аминогруппами на последнем поколении структурных звеньев;

A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S-или -CH₂-.

В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой -N(CH₃).

В некоторых вариантах осуществления дендример любой из формул (I), (II), (III), (IV) и (V) содержит менее $(2^x)^b$ групп L-AA, где x представляет собой число поколений дендримера, а b представляет собой число дендронов. В некоторых вариантах осуществления все поверхностные функциональные группы присоединены ковалентной связью к группам L-AA. В некоторых вариантах осуществления, когда x составляет 5, дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 64 групп L-AA. В не-

которых вариантах осуществления дендример содержит не более 2^x групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит 2^x групп L-AA. Например, если структурное звено дендримера содержит одну бифункциональную точку ветвления, дендример второго поколения будет содержать не более 4 групп L-AA, дендример третьего поколения будет содержать не более 8 групп L-AA, дендример четвертого поколения будет содержать не более 16 групп L-AA, дендример пятого поколения будет содержать не более 32 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления, дендример содержит менее 2^x групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 64 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 40 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит не более 32 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 25 до приблизительно 32 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит от приблизительно 28 до приблизительно 32 групп L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример содержит 29 групп L-AA, 30 групп L-AA, 31 группу L-AA или 32 группы L-AA.

В некоторых вариантах осуществления в любом из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) сумма групп L-AA и групп PEG может равняться не более 64. В некоторых вариантах осуществления сумма групп L-AA и групп PEG может составлять менее 64, при условии, что дендример содержит по меньшей мере одну группу L-AA. В некоторых вариантах осуществления сумма групп L-AA и групп PEG может составлять от приблизительно 50 до приблизительно 64. В случае если сумма групп L-AA и групп PEG составляет менее 64, не вступившие в реакцию поверхностные функциональные звенья последнего поколения структурных звеньев остаются первичными аминогруппами, при условии, что дендример содержит по меньшей мере одну группу L-AA. Например, число первичных аминогрупп на последнем поколении структурных звеньев равняется 64 минус сумма групп L-AA и PEG (например, $64 - (L-AA + PEG)$) при условии, что дендример содержит по меньшей мере одну группу L-AA. Например, если сумма групп L-AA и групп PEG составляет 50, то 14 поверхностных функциональных групп останутся первичными аминофрагментами, если сумма групп L-AA и PEG групп составляет 51, то 13 из поверхностных функциональных групп останутся первичными аминофрагментами, если сумма групп L-AA и групп PEG составляет 52, то 12 из поверхностных функциональных групп останутся первичными аминофрагментами, если сумма групп L-AA и групп PEG составляет 53, то 11 из поверхностных функциональных групп останутся первичными аминофрагментами и т.д. В некоторых вариантах осуществления число первичных аминофрагментов на дендримере составляет от приблизительно 0 до приблизительно 14. В некоторых вариантах осуществления если сумма числа групп PEG и числа групп L-AA составляет менее $(2^x)b$, при этом x представляет собой число поколений дендримера, а b представляет собой число дендронов, то оставшиеся поверхностные функциональные группы равняются 64 минус сумма групп PEG и групп L-AA, при условии, что дендример содержит по меньшей мере одну группу L-AA.

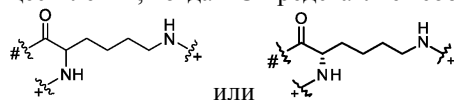
В некоторых вариантах осуществления W представляет собой $(PM)_e$ или $(H)_e$; Z представляет собой $(L-AA)_d$ или $(H)_e$ при условии, что $(c+d) \leq (2^x)b$; и при условии, что d составляет ≥ 1 ; где x представляет собой число поколений, а b представляет собой число дендронов; и при условии, что если $(c+d) < (2^x)b$, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой $(H)_e$, где e составляет $[2^{(x+1)}] - (c+d)$. Например, когда b составляет 2 и x составляет 5, тогда $(c+d) \leq 64$. В некоторых вариантах осуществления $(c+d) = 64$, т.е. сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$ равняется 64. В некоторых вариантах осуществления, когда b составляет 2 и x составляет 5, тогда $(c+d) < 64$; т.е. сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$ меньше 64, при условии, что d составляет ≥ 1 . В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет целое число от 50 до 64. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет целое число от 58 до 64.

В некоторых вариантах осуществления $(c+d) = (2^x)b$, в этом случае $(H)_e$ отсутствуют и e составляет 0. Например, если b составляет 2 и x составляет 5, а сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$ равняется 64, то незамещенные поверхностные функциональные группы на пятом поколении структурных звеньев в дендримере отсутствуют и, следовательно, e составляет 0. Однако, если $(c+d) < (2^x)b$, то $(H)_e$ равняется $(2^x)b - (c+d)$. Например, если b составляет 2, x составляет 5 и сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$ составляет менее 64, то число незамещенных поверхностных функциональных групп на пятом поколении структурных блоков равняется 64 минус сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$. В таком случае e равняется 64 минус сумма $(PM)_e$ и $(L-AA)_d$. В некоторых вариантах осуществления, когда сумма $(c+d)$ составляет целое число от 50 до 64, e составляет целое число от 0 до 14. В некоторых вариантах осуществления, когда $(c+d)$ составляет целое число от 58 до 64, e составляет целое число от 0 до 6. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 58 и e составляет 6. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 59 и e составляет 5. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 60 и e составляет 4. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 61 и e составляет 3. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 62 и e составляет 2. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 63 и e составляет 1. В некоторых вариантах осуществления $(c+d)$ составляет 60 и e составляет 0.

В некоторых вариантах осуществления любой из дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) характеризуется молекулярной массой от приблизительно 90 до приблизительно 120 кДа. В некоторых вариантах осуществления дендример характеризуется молекулярной массой от приблизительно 100 до

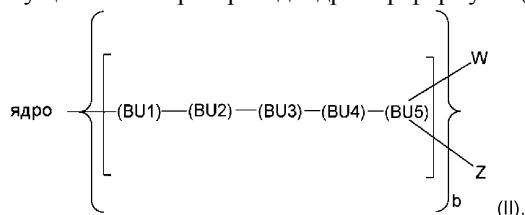
115 кДа. В некоторых вариантах осуществления дендример характеризуется молекулярной массой от приблизительно 100 до приблизительно 110 кДа. В некоторых вариантах осуществления дендример характеризуется молекулярной массой от приблизительно 100 до приблизительно 105 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса дендримера составляет приблизительно 100 кДа, приблизительно 101 кДа, приблизительно 102 кДа, приблизительно 103 кДа, приблизительно 104 кДа, приблизительно 105 кДа, приблизительно 106 кДа, приблизительно 107 кДа, приблизительно 108 кДа, приблизительно 109 кДа или приблизительно 110 кДа.

В некоторых вариантах осуществления, когда BU представляет собой:



PEG прикреплен ковалентной связью к функциональной аминогруппе в ϵ -положении BU, а L-AA присоединен ковалентной связью к функциональной аминогруппе в α -положении BU.

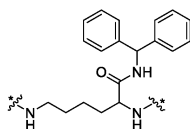
В некоторых вариантах осуществления раскрыт дендример формулы (II)



или его фармацевтически приемлемая соль,

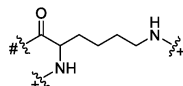
где b составляет 2;

ядро представляет собой:



* обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом (BU1);

BU представляют собой структурные звенья, и число BU равняется 62, где BU характеризуется следующей структурой:



обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом ядра или аминфрагментом BU;

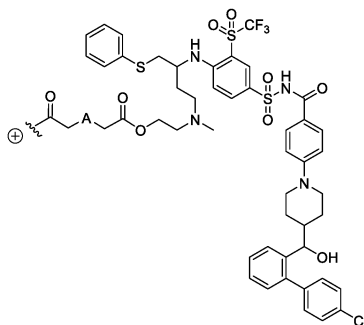
+ обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом BU или ковалентную связь с W или Z;

W независимо представляет собой $(PM)_e$ или $(H)_e$;

Z независимо представляет собой $(L-AA)_d$ или $(H)_e$;

PM представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀ или PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀;

L-AA представляет собой линкер, присоединенный ковалентной связью к активному средству; где L-AA представлен формулой



где A представляет собой $-N(CH_3)$, $-O-$, $-S-$ или $-CH_2-$;

$\oplus$ обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом BU5;

при условии, что $(c+d)$ составляет ≤ 64 , а d составляет ≥ 1 ; и

при условии, что если $(c+d) < 64$, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой $(H)_e$, где e составляет $64-(c+d)$.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) $(PM)_e$ представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀, а A представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления $(PM)_e$ представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀, а A представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II)

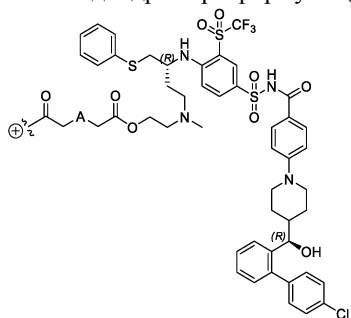
(PM)_c представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀, а А представляет собой -N(CH₃). В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) (PM)_c представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀, а А представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) (PM)_c представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀, а А представляет собой -CH₂-.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет целое число от 25 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет целое число от 29 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет 29. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет 30. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет 31. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) с составляет 32.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет целое число от 25 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет целое число от 29 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет 29. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет 30. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет 31. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) d составляет 32.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет целое число от 0 до 14. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет целое число от 0 до 6. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 0. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 1. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 2. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 3. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 4. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 5. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) e составляет 6.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (II) L-AA представляет собой:

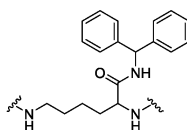


В некоторых вариантах осуществления раскрыт дендример формулы (III)

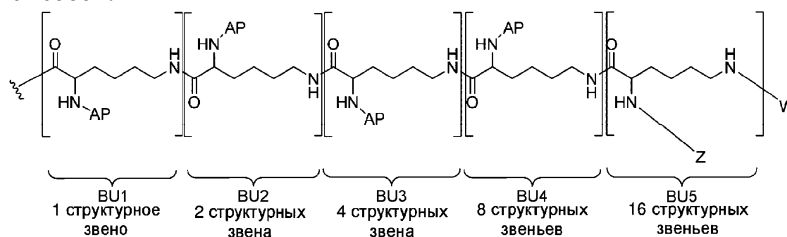
D-ядро-D (III),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где ядро представляет собой:



D представляет собой:



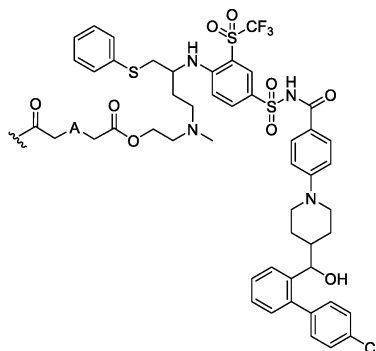
AP представляет собой точку прикрепления к другому структурному звену;

W независимо представляет собой (PM)_c или (H)_c;

Z независимо представляет собой (L-AA)_d или (H)_c;

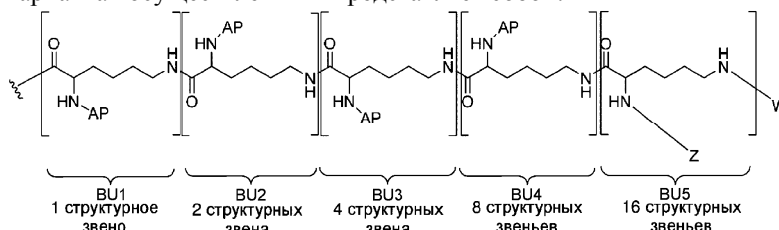
PM представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀ или PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀;

L-AA представляет собой линкер, присоединенный ковалентной связью к активному средству, где L-AA представлен формулой



где А представляет собой $-N(CH_3)$, $-O-$, $-S-$ или $-CH_2-$;
при условии, что если $(c+d) < 64$, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой $(H)_e$, где e составляет $64-(c+d)$; а d составляет ≥ 1 .

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой:



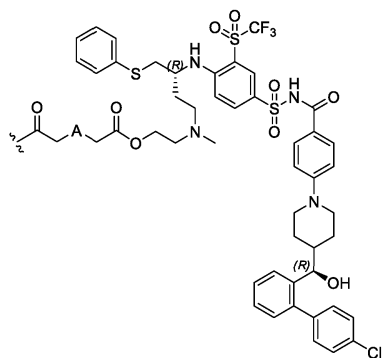
В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) $(PM)_c$ представляет собой $PEG_{900-1200}$, а А представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) $(PM)_c$ представляет собой $PEG_{1800-2400}$, а А представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) $(PM)_c$ представляет собой $PEG_{1800-2400}$, а А представляет собой $-N(CH_3)$. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) $(PM)_c$ представляет собой $PEG_{1800-2400}$, а А представляет собой $-S-$. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) $(PM)_c$ представляет собой $PEG_{1800-2400}$, а А представляет собой $-CH_2-$.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет целое число от 25 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет целое число от 29 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет 29. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет 30. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет 31. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) с составляет 32.

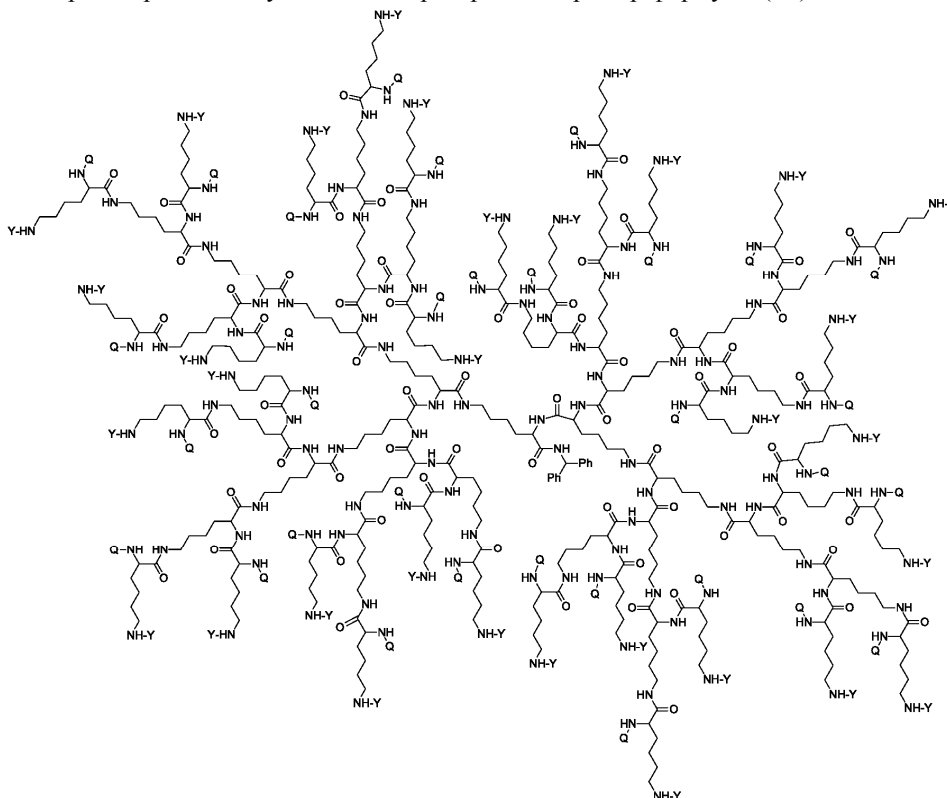
В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет целое число от 25 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет целое число от 29 до 32. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет 29. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет 30. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет 31. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) d составляет 32.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет целое число от 0 до 14. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет целое число от 0 до 6. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 0. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 1. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 2. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 3. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 4. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 5. В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) e составляет 6.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (III) L-AA дендримера формулы (III) представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления раскрыт дендример формулы (IV)

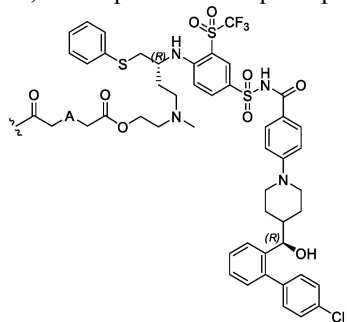


(IV),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;

Q представляет собой H или L-AA, в котором L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),

при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (IV) A представляют собой -N(CH₃). В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (IV) A представляет собой -S-.

В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (IV) содержит от 25 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (IV) содержит от 29 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (IV) содержит 29 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

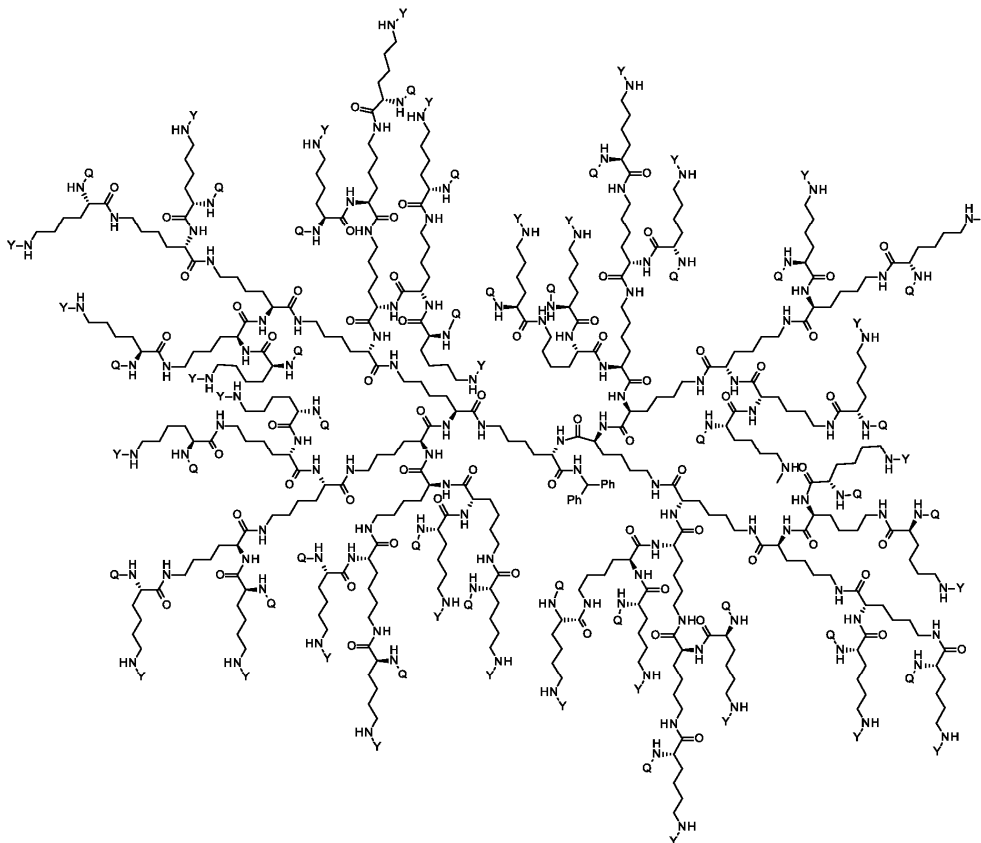
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (IV) содержит 30 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 31 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит от 25 до 32 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит от 29 до 32 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 29 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 30 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 31 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит 32 L-AA.

В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит от 0 до 14 атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит от 0 до 6 атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит один атом водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит два атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит три атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит четыре атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит пять атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендимер формулы (IV) содержит шесть атомов водорода в положениях Q и/или Y.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт дендимер формулы (V)

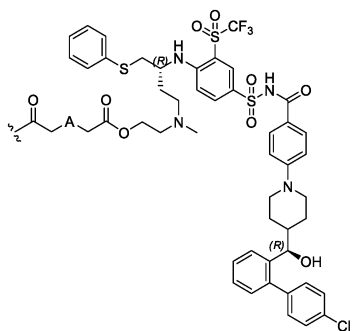


(V),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;

Q представляет собой H или L-AA, в котором L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),
при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.

В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (V) A представляет собой -N(CH₃).
В некоторых вариантах осуществления дендримера формулы (V) A представляет собой -S-.

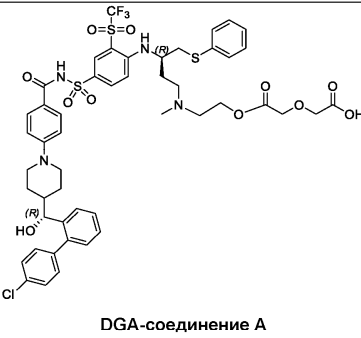
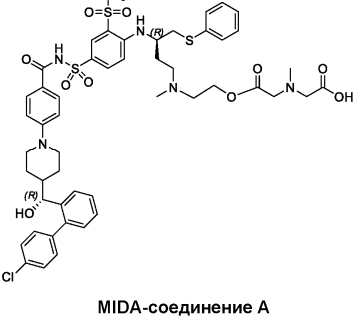
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 25 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 29 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 29 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 30 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 31 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 25 до 32 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 29 до 32 L-AA.
В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 29 L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 30 L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 31 L-AA. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит 32 L-AA.

В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 0 до 14 атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит от 0 до 6 атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит один атом водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит два атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит три атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит четыре атома водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит пять атомов водорода в положениях Q и/или Y. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (V) содержит шесть атомов водорода в положениях Q и/или Y.

В некоторых вариантах осуществления также раскрыты соединения со следующей структурой:

Glu-соединение A	5-(2-(((R)-3-(4-(N-(4-(4-((R)-(4'-хлорбифенил-2-ил)(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)бензоил)сульфамоил)-2-(трифторметилсульфонил)фениламино)-4-(фенилтио)бутил)(метил)амино)этокси)-5-оксопентановая кислота
	2-(2-(2-(((R)-3-(4-(N-(4-(4-((R)-(4'-хлорбифенил-2-ил)(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)бензоил)сульфамоил)-2-(трифторметилсульфонил)фениламино)-4-(фенилтио)бутил)(метил)амино)этокси)-2-оксоэтилтио)уксусная кислота

TDA-соединение A 	2-(2-(2-(((R)-3-(4-(N-(4-(4-((R)-(4'-хлорбифенил-2-ил)(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)бензоил)сульфамойл)-2-(трифторметилсульфонил)фениламино)-4-(фенилтио)бутил)(метил)амино)этокси)-2-оксоэтокси)уксусная кислота
DGA-соединение A 	2-(2-(2-(((R)-3-(4-(N-(4-(4-((R)-(4'-хлорбифенил-2-ил)(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)бензоил)сульфамойл)-2-(трифторметилсульфонил)фениламино)-4-(фенилтио)бутил)(метил)амино)этокси)-2-оксоэтил)(метил)амино)уксусная кислота

Выражение "фармацевтически приемлемая соль" предусматривает соли присоединения кислоты или основания, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) и которые обычно не являются биологически или другим образом нежелательными. Во многих случаях дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) способны образовывать соли присоединения кислоты и/или основания за счет присутствия основных и/или карбоксильных групп или групп, подобных им.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут формироваться с помощью неорганических кислот и органических кислот, например ацетатная, аспартатная, бензоатная, безилатная, бромидная/гидробромидная, бикарбонатная/карбонатная, бисульфатная/сульфатная, камфорсульфонатная, хлоридная/гидрохлоридная, хлортеофиллатная, цитратная, этандисульфатная, fumarатная, глюцептатная, глюконатная, глюкуронатная, гиппуратная, гидрохлоридная/йодидная, изотионатная, лактатная, лактобионатная, лаурилсульфатная, малатная, малеатная, малонатная, манделатная, мезилатная, метилсульфатная, нафтаатная, напсилатная, никотинатная, нитратная, октадеканатная, олеатная, оксалатная, пальмитатная, пальмоатная, фосфатная/гидрофосфатная/дигидрофосфатная, полигалактуронатная, пропионатная, стеаратная, сукцинатная, субсалицилатная, сульфатная/гидросульфатная, тартратная, тозилатная и трифторацетатная соли. Неорганические кислоты, из которых можно получить соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Органические кислоты, из которых можно получать соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту, сульфосалициловую кислоту и т.п.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут формироваться с помощью неорганических и органических оснований. Неорганические основания, из которых можно получить соли, включают, например, аммиак и соли аммония и металлы из групп I-XII Периодической таблицы. В определенных вариантах осуществления соли получают из натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; особенно подходящие соли включают соли аммония, калия, натрия, кальция и магния. Органические основания, из которых можно получать соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины, катионообменные смолы и т.п. Некоторые органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтиламин, диэтиламин, лизин, меглюмин, пиперазин и триметамин.

Фармацевтически приемлемые соли дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) можно синтезировать из основного или кислотного фрагмента посредством традиционных химических способов. Обычно такие соли можно получать за счет приведения форм свободной кислоты данных соединений в реакцию со стехиометрическим количеством соответствующего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или K^+ и т.п.) или за счет приведения форм свободного основания данных соединений в реакцию со стехиометрическим количеством соответствующей кислоты. Такие реак-

ции, как правило, проводят в воде, или в органическом растворителе, или в смеси обоих. Обычно желательным, где это применимо, является применение неводных сред, таких как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Перечни дополнительных подходящих солей можно найти, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985); Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19 и в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

Любая формула, приведенная в данном документе, также может представлять немеченные формы, а также меченные изотопом формы дендримеров формулы (I), (II), (III), (IV) и (V). Меченные изотопом соединения характеризуются структурой, изображенной с помощью формул, приведенных в данном документе, за исключением того, что один или несколько атомов замещены на атом того же элемента, но с отличающимся массовым числом. Примеры изотопов, которые могут быть включены в дендример формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) и его соли, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S и ^{125}I . Дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) могут предусматривать различные меченные изотопом соединения, в которых присутствуют радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{35}S и ^{36}Cl . Меченные изотопом дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) обычно можно получить с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области, или с помощью способов, аналогичных описанным в прилагаемых примерах, с применением соответствующих меченных изотопом реагентов вместо немеченных реагентов, используемых ранее.

Дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) могут иметь разные изомерные формы. Выражения "оптический изомер" или "стереоизомер" относятся к любой из различных стереоизомерных конфигураций, которые могут существовать для данного дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) и (V). В частности, дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) обладают хиральностью и, соответственно, могут существовать в виде смесей энантиомеров с энантиомерным избытком от приблизительно 0 до >98% э.и. Когда соединение представляет собой чистый энантиомер, стереохимия по каждому хиральному центру может быть указана либо как R, либо как S. Такие обозначения также можно применять для смесей, которые обогащены одним энантиомером. Выделенные соединения, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут быть обозначены (+) или (-), в зависимости от направления (право- или левовращающие), в котором они вращают плоскость поляризованного света при длине волны D-линии натрия. Подразумевается, что в настоящее изобретение включены все такие возможные изомеры, включая рацемические смеси, оптически чистые формы и смеси с промежуточными соединениями. Оптически активные (R)- и (S)-изомеры можно получать с применением хиральных синтонов, хиральных реагентов или хиральных катализаторов или можно выделять с применением традиционных методик, широко известных из уровня техники, таких как хиральная HPLC.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления раскрыты фармацевтические композиции, содержащие дендример формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

Выражение "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель" предусматривает соединения, материалы, композиции и/или лекарственные формы, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, установленных специалистом в данной области.

Раскрытые композиции могут находиться в форме, подходящей для перорального применения (например, в виде таблеток, пастилок, твердых или мягких желатиновых капсул, водных или масляных суспензий, эмульсий, диспергируемых порошков или гранул, сиропов или настоек), для местного применения (например, в виде кремов, мазей, гелей или водных или масляных растворов или суспензий), для введения путем ингаляции (например, в виде тонкодисперсного порошка или жидкостного аэрозоля), для введения путем инсуффляции (например, в виде тонкодисперсного порошка) или для парентерального введения (например, в виде стерильного водного или масляного раствора для внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутримышечного введения дозы или в виде суппозитория для ректального введения доз).

Раскрытые композиции можно получать с помощью традиционных процедур с применением традиционных фармацевтических вспомогательных веществ, хорошо известных из уровня техники. Таким образом, композиции, предназначенные для перорального применения, могут содержать, например, один или несколько красителей, подсластителей, ароматизаторов и/или консервантов.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для состава в виде таблеток могут включать, например, инертные разбавители, такие как лактоза, карбонат натрия, фосфат кальция или карбонат кальция; гранулообразующие средства и разрыхлители, такие как кукурузный крахмал или альгинатная кислота; связующие средства, такие как крахмал; смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк; консерванты, такие как этил- или пропил-п-гидроксibenзоат; и антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота. Составы в виде таблеток могут быть непокрытыми или

покрытыми либо для модификации их распадаемости и последующего всасывания активного ингредиента в желудочно-кишечном тракте, либо для улучшения их стабильности и/или внешнего вида с применением традиционных средств и процедур для нанесения покрытия, хорошо известных из уровня техники.

Композиции для перорального применения могут быть представлены в форме твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в форме мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или маслом, таким как арахисовое масло, вазелиновое масло или оливковое масло.

Водные суспензии могут содержать активный ингредиент в тонкоизмельченной форме или в форме нано- или микронизированных частиц вместе с одним или несколькими суспендирующими средствами, такими как карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующими или смачивающими средствами, такими как лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами (например, полиоксиэтиленстеарат), или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадекаэтиленоксицетанолом, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбит моноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например гептадекаэтиленоксицетанолом, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбит моноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например полиэтиленсорбитана моноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, таких как этил- или пропил-пара-гидроксibenzoат, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, красители, ароматизаторы и/или подсластители, такие как сахароза, сахарин или аспартам.

Масляные суспензии могут быть составлены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, таком как арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло или кокосовое масло, или в минеральном масле, таком как вазелиновое масло. Масляные суспензии также могут содержать загуститель, такой как пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители и ароматизаторы могут быть добавлены для обеспечения приятного вкуса у препарата для перорального применения. Данные композиции можно подвергать консервации путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, могут содержать активный ингредиент вместе с диспергирующим или смачивающим средством, суспендирующим средством и одним или несколькими консервантами. Примером подходящих диспергирующих или смачивающих средств, а также суспендирующих средств являются средства, упомянутые выше. Также могут присутствовать дополнительные вспомогательные вещества, такие как подсластители, ароматизаторы и красители.

Фармацевтические композиции также могут быть представлены в форме эмульсий типа "масло в воде". Масляная фаза может представлять собой растительное масло, такое как оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, такое как, например, вазелиновое масло, или любые их смеси. Подходящие эмульгаторы могут представлять собой, например, встречающиеся в природе камеди, такие как аравийская камедь или трагакантовая камедь, встречающиеся в природе фосфатиды, такие как соевый лецитин, сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита (например, сорбитана моноолеат), и продукты конденсации указанных неполных сложных эфиров с этиленоксидом, такие как полиоксиэтиленсорбитана моноолеат. Эмульсии могут также содержать подсластители, ароматизаторы и консерванты.

Сиропы и настойки могут быть составлены с подсластителями, такими как глицерин, пропиленгликоль, сорбит, аспартам или сахароза, и также могут содержать средство, уменьшающее раздражение, консервант, ароматизатор и/или краситель.

Фармацевтические композиции также могут быть представлены в форме стерильного инъекционного раствора в одной или нескольких водных и неводных нетоксичных приемлемых для парентерального введения буферных системах, разбавителях, солюбилизующих средствах, сорастворителях или носителях, таких как этанол, Solutol HS15, PEG400, Tween 80, бензиловый спирт, NN-диметилацетамид, пропиленгликоль, Cremophor, HP- β -CD, циклодекстрин SBE- β -1865. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильную инъекционную водную или масляную суспензию или суспензию в неводном разбавителе, носителе или сорастворителе, которая может быть составлена согласно известным процедурам с применением одного или нескольких соответствующих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств.

Фармацевтические композиции могут представлять собой раствор для iv болюсной/инфузионной инъекции, стерильный дендример для разбавления с помощью буферной системы или лиофилизированную систему (либо дендример отдельно, либо с вспомогательными веществами) для разбавления с помощью буферной системы, либо без других вспомогательных веществ. Лيوфилизированный высушен-

ный сублимацией материал может быть получен на основе неводных растворителей (например, трет-бутанола или уксусной кислоты) или водных растворителей. Лекарственная форма также может представлять собой концентрат для дальнейшего разбавления с последующей инфузией.

Композиции для введения путем ингаляции могут быть представлены в форме традиционного аэрозоля, находящегося под давлением, предназначенного для распределения активного ингредиента либо в виде аэрозоля, содержащего мелкодисперсное твердое вещество, либо в виде капель жидкости. Можно применять традиционные пропелленты для аэрозолей, такие как летучие фторированные углеводороды или углеводороды, и в целях удобства аэрозольное устройство устроено таким образом, чтобы высвободить отмеренное количество активного ингредиента.

Количество активного ингредиента, которое можно объединить с одним или несколькими вспомогательными веществами для получения единичной лекарственной формы, будет неизбежно варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению реципиента и конкретного пути введения. Для дополнительной информации о путях введения и режимах дозирования читатель может обратиться к главе 25.3 тома 5 *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) можно вводить один, два, три раза в сутки или столько раз в течение 24-часового периода, как это необходимо с медицинской точки зрения. Специалист в данной области сможет легко определить их количество в каждой индивидуальной дозе в зависимости от субъекта. В некоторых вариантах осуществления дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) вводят в одной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления дендримеры формулы (I), (II), (III), (IV) и (V) вводят в нескольких лекарственных формах.

Способ применения.

В одном аспекте раскрыты способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака.

В одном аспекте раскрыто применение дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

В одном аспекте раскрыты фармацевтические композиции, содержащие дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемую соль, для применения в лечении рака.

Термин "рак" предусматривает, без ограничения, гематологические (например, лимфомы, лейкозы) и солидные злокачественные новообразования. Например, термин "рак" предусматривает Т-клеточные лейкозы, Т-клеточные лимфомы, острую лимфобластную лимфому (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), острый моноцитарный лейкоз (AML), множественную миелому, лимфому из клеток мантийной зоны, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта, неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому и солидные опухоли, например, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC, например NSCLC с мутацией EGF, NSCLC с мутацией KRAS), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак молочной железы, нейробластома, рак яичника, рак предстательной железы, меланому (например, меланому с мутацией BRAF, меланому с мутацией KRAS), рак поджелудочной железы, матки, эндометрия и рак толстой кишки (например, рак толстой кишки с KRAS, рак толстой кишки с мутацией BRAF).

В одном аспекте раскрыты способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством второго противоракового средства или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль в комбинации с эффективным количеством второго противоракового средства или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении рака.

В одном аспекте раскрыто применение дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством противоракового средства или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

В одном аспекте раскрыты фармацевтические композиции, содержащие дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с эффективным количеством второго противоракового средства или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении рака.

Выражение "в комбинации с" предусматривает введение дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли и противоракового средства или его фармацевтически приемлемой соли последовательно, отдельно или одновременно. В некоторых аспектах дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль и второе противораковое средство или его фармацевтически приемлемую соль могут вводиться в одном и том же составе, например в составе с фиксированной комбинацией доз. В некоторых вариантах осуществления дендример

формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль и второе противораковое средство или его фармацевтически приемлемая соль могут вводиться в отдельных составах и вводиться практически одновременно, последовательно или отдельно.

Выражение "противораковое средство" предусматривает, без ограничения, лучевую терапию, алкилирующие средства, ингибиторы ангиогенеза, антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, антиметаболиты, антимитотики, антипролиферативные средства, противовирусные средства, ингибиторы киназы Aurora, другие активаторы клеточной гибели (например, другие ингибиторы Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1 или ингибиторы Mcl), активаторы путей с участием рецепторов клеточной гибели (например, агонисты FAS или TRAIL), ингибиторы киназы Bcr-Abl, ингибиторы BET (бромодомена), антитела BiTE (биспецифические активаторы T-клеток), модификаторы биологического ответа, ингибиторы циклинзависимой киназы, ингибиторы клеточного цикла, ингибиторы циклооксигеназы-2, DVD (антитела с двойными варьируемыми доменами), ингибиторы рецептора гомолога онкогена вирусного лейкоза (ErbB2), ингибиторы фактора роста, ингибиторы EGFR, ингибиторы белков теплового шока (HSP), ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), гормональные терапевтические средства, иммунологические средства, ингибиторы ингибиторов белков апоптоза (IAP), интеркалирующие антибиотики, ингибиторы киназ, ингибиторы кинезина, ингибиторы Jak2, ингибиторы мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR), ингибиторы АКТ, ингибиторы микроРНК, ингибиторы митоген-активируемой внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (MEK), ингибиторы BRAF, мультивалентные связывающие белки, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), ингибиторы поли-АДФ-(аденозиндифосфат)рибоза-полимеразы (PARP), химиотерапевтические средства на основе платины, ингибиторы polo-подобных киназ (Plk), ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы, ингибиторы протеасом, аналоги пуринов, аналоги пиримидинов, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ретиноиды/дельтоиды, алкалоиды растений, малые ингибирующие рибонуклеиновые кислоты (siRNA), соединения на основе антител к CD20, ингибиторы топоизомеразы и ингибиторы убиквитинлигазы.

Алкилирующие средства включают алтьретамин, AMD-473, AP-5280, апазиковон, бендамустин, бросталлицин, бусульфид, цисплатин, карбоплатин, карбоксон, кармусти (BCNU), хлорамбуцил, CLORE-TAZINE® (ларомустин, VNP 40101M), циклофосфамид, декарбазин, эстрамусти, фотемустин, глютексфамид, ифосфамид, KW-2170, ломустин (CCNU), мафосфамид, мелфалан, митобронитол, митолактол, нимустин, азотистый иприт, N-оксид, нитрозомочевина, оксалиплатин, ранимусти, темозоломид, тиоптеп, TREANDA® (бендамустин), треосульфид, рофосфамид и т.п.

Ингибиторы ангиогенеза включают ингибиторы специфических для эндотелия рецепторов (Tie-2), ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), ингибиторы рецептора инсулиноподобного фактора роста-2 (IGFR-2), ингибиторы матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), ингибиторы матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9), ингибиторы рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), аналоги тромбоспондина, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), ингибиторы ALK и т.п.

Антиметаболиты включают ALIMTA® (пеметрексед динатрия, LY231514, MTA), 5-азациитидин, XELODA® (капецитабин), кармофур, LEUSTAT® (кладрибин), клофарабин, цитарабин, цитарабина оксифосфат, цитозина арабинозид, децитабин, дефероксамин, доксифлуридин, эфлорнитин, EICAR (5-этинил-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид), эноцитабин, этенилцитидин, флударабин, 5-фторурацил отдельно или в комбинации с лейковорином, GEMZAR® (гемцитабин), гидроксимочевину, ALKERAN® (мелфалан), меркаптопурин, 6-меркаптопурина рибозид, метотрексат, микофенольную кислоту, неларабин, нолатрексед, оксифосфат, пелитрексол, пентостатин, пемекстред, ралитрексед, рибавирин, триапин, триметрексед, S-1, тиазофуридин, тегафур, TS-1, видарабин, UFT и т.п.

Ингибиторы белков Bcl-2 включают ABT-199, AT-101 ((-)госипол), GENASSENSE® (G3139 или облимерсен (антисмысловый олигонуклеотид, целенаправленно воздействующий на Bcl-2)), IPI-194, IPI-565, ABT-737, ABT-263, GX-070 (обатоклак), AMG-176, S63645 и т.п.

Соединения на основе антитела к CD20 включают ритуксимаб и обинтузумаб.

Ингибиторы Btk включают ибрутиниб и акалабрутиниб.

Ингибиторы бромодомена включают I-BET 762, OTX-015, CPI-203, LY294002 и т.п.

Ингибиторы CDK включают BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, флавопиридол, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PHA-690509, селициклиб (CYC-202, R-роковитин), ZK-304709, AZD4573 и т.п.

Ингибиторы EGFR включают антитела к EGFR, ABX-EGF, иммунолипосомы на основе антител к EGFR, вакцину на основе EGF, EMD-7200, ERBITUX® (цетуксимаб), HR3, антитела IgA, IRESSA® (гефитиниб), TARCEVA® (эрлотиниб или OSI-774), TP-38, слитый белок на основе EGFR, TYKERB® (лапатиниб), TAGRISSO (AZD9291, осимертиниб) и т.п.

Ингибиторы ALK включают кризотиниб, церитиниб и т.п.

Ингибиторы рецептора ErbB2 включают CP-724-714, CI-1033 (канертиниб), HERCEPTIN® (трастузумаб), TYKERB® (лапатиниб), OMNITARG® (2C4, петузумаб), TAK-165, GW-572016 (ионафарниб), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (вакцина на основе HER2), APC-8024 (вакцина на основе HER-2),

биспецифическое антитело к HER/2neu, B7.her2IgG3, в качестве бифункциональных биспецифических антител к HER2, mAB AR-209, mAB 2B-1 и т.п.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело к CD22-MC-MMAF, антитело к CD22-MC-MMAE, антитело к CD22-MCC-DM1, CR-011-vcMMAE, PSMA-ADC (например, MEDI3726), MEDI-547, SGN-19Am, SGN-35, SGN-75 и т.п.

Ингибиторы кинезина включают ингибиторы Eg5, такие как AZD4877, ARRY-520; ингибиторы CENPE, такие как GSK923295A и т.п.

Ингибиторы MEK включают траметиниб (GSK1120212), биниметиниб (MEK162), селуметиниб (AZD6244), кобиметиниб (XL518), ARRY-142886, ARRY-438162, PD-325901, PD-98059 и т.п.

Ингибиторы BRAF включают сорафениб, вемурафениб, дабрафениб, GDC-0879, LGX818 и т.п.

Химиотерапевтические средства на основе платины включают цисплатин, ELOXATIN® (оксалиплатин) эптаплатин, лобоплатин, недаплатин, PARAPLATIN® (карбоплатин), сатраплатин, пикоплатин и т.п.

Ингибиторы VEGFR включают AVASTIN (бевацизумаб), ABT-869, AEE-788, ANGIOZYME™ (рибозим, который ингибирует ангиогенез (Ribozyme Pharmaceuticals (Боулдер, Колорадо) и Chiron (Эмerville, Калифорния)), акситиниб (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (пегаптамиб), NEXAVAR® (сорафениб, BAY43-9006), пазопаниб (GW-786034), ваталаниб (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (сунитиниб, SU-11248), ловушку для VEGF, ZACTIMA™ (вандетаниб, ZD-6474), GA101, офатумумаб, ABT-806 (mAb-806), ErbB3-специфические антитела, BSG2-специфические антитела, DLL4-специфические антитела (например, MEDI0629) и C-met-специфические антитела и т.п.

Ингибиторы WEE1 включают AZD1775 и т.п.

Противоопухолевые антибиотики включают интеркалирующие антибиотики, акларубицин, актиномицин D, амрубицин, аннамицин, адриамицин, BLENOXANE® (блеомицин), даунорубицин, CAELYX® или MYOCET® (липосомальный доксорубицин), элзамитруцин, эпирубуцин, гларубидин, ZAVEDOS® (идарубицин), митоминин C, неморубицин, неокарзиностаин, пепломицин, пирарубицин, ребеккамицин, стимуламер, стрептозоцин, VALSTAR® (валрубицин), циностаин и т.п.

Ингибиторы механизмов репарации ДНК, такие как киназа CHK; ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы; ингибиторы поли(АДФ-рибоза)полимеразы (ингибиторы PARP), включая ABT-888 (велипариб), олапариб, KU-59436, AZD-2281, AG-014699, BSI-201, BGP-15, INO-1001, ONO-2231 и т.п.; а также ингибиторы Hsp90, такие как танеспимицин и ретаспимицин.

Ингибиторы протеасом включают VELCADE® (бортезомиб), KYPROLIS (карфилзомиб), NINLARO (иксазомиб), MG132, NPI-0052, PR-171 и т.п.

Примеры иммунологических средств включают интерфероны и другие иммуностимулирующие средства. Интерфероны включают интерферон альфа, интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерферон бета, интерферон гамма-1a, ACTIMMUNE® (интерферон гамма-1b) или интерферон гамма-n1, их комбинации и т.п. Другие средства включают ALFAFERONE®, (IFN-α), BAM-002 (окисленный глутатион), BEROMUN® (тазонермин), BEXXAR® (тозитумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), декарбазин, денилейкин, эпратузумаб, GRANOCYTE® (ленограстим), лентинан, лейкоцитарный альфа-интерферон, имиквимод, MDX-010 (антитело к CTLA-4), вакцина против меланомы, митумомаб, молграмостим, MY-LOTARG™ (гемтузумаб-озогамицин), NEUPOGEN® (филграстим), OncoVAC-CL, OVAREX® (ореговомаб), пемтумомаб (Y-muHMFGEI), PROVENGE® (сипулейцел-Т), саргарамостим, сизофилин, тецелейкин, THERACYS® (бацилла Кальметта-Герена), убенимекс, VIRULIZIN® (иммунотерапевтическое средство, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (специфическое вещество Маруямы (SSM)), WF-10 (тетрахлордекаоксид (TCDO)), PROLEUKIN® (альдеслейкин), ZADAXIN® (тималфасин), ZENAPAX® (даклизумаб), ZEVALIN® (90Y-ибритумомаб-тиуксетан) и т.п.

Аналоги пиримидинов включают цитарабин (ара С или арабинозид С), цитозина арабинозид, доксифлуридин, FLUDARA® (флударабин), 5-FU (5-фторурацил), флоксуридин, GEMZAR® (гемцитабин), TOMUDEX® (ралтитрексед), TROXATYL™ (триацетилауридина троксацитабин) и т.п.

Антимитотические средства включают батабулин, эпотилон D (KOS-862), N-(2-((4-гидроксифенил)-амино)пиридин-3-ил)-4-метоксибензолсульфонамид, иксабепилон (BMS 247550), паклитаксел, TAXOTERE® (доцетаксел), PNU100940 (109881), патупилон, XRP-9881 (ларотаксел), винфлулин, ZK-EPO (синтетический эпотилон) и т.п.

Кроме того, дендримеры формулы (I), (II), (III) и (IV) можно объединять с другими химиотерапевтическими средствами, такими как ABRAXANE™ (ABI-007), ABT-100 (ингибитор фарнезилтрансферазы), ADVEXIN® (вакцина на основе Ad5CMV-p53), ALTOCOR® или MEVACOR® (ловастатин), AMPLIGEN® (поли 1:поли C12U, синтетическая РНК), APTOSYN® (эксисулинд), AREDIA® (памидроновая кислота), арглабин, L-аспарагиназа, атаместан (1-метил-3,17-дион-андроста-1,4-диен), AVAGE® (тазаротен), AVE-8062 (производное комбреастатина), BEC2 (митумомаб), кахектин или кахексии (фактор некроза опухоли), канваксин (вакцина), CEAVAC® (противораковая вакцина), CELEUK® (цельмолейкин), CEPLENE® (дигидрохлорид гистамина), CERVARIX® (вакцина против вируса папилломы че-

ловека), CHOP® (C: CYTOXAN® (циклофосфамид); H: ADRIAMYCIN® (гидроксидоксорибицин); O: винкристин (ONCOVIN®); P: преднизон), СУРАТ™ (ципротерона ацетат), комбрестатин A4P, DAB(389)EGF (каталитический и транслокационный домены дифтерийного токсина, слитые посредством линкера His-Ala с эпидермальным фактором роста человека) или TransMID-107R™ (дифтерийные токсины), дакарбазин, дактиномицин, 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA), этилурацил, EVIZON™ (сквалямина лактат), DIMERICINE® (лосьон на основе липосом с T4N5), дискодермолид, DX-8951f (эксцелатекана мезилат), энзастаурин, EPO906 (эпитилон B), GARDASIL® (квадривалентная рекомбинантная вакцина против вируса папилломы человека (типов 6, 11, 16, 18)), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (вакцина на основе конъюгата ганглиозида), GVAX® (вакцина против рака предстательной железы), галофугинон, гистерелин, гидроксикарбамид, ибандроновая кислота, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (цинтредекин-безудотокс), IL-13-экзотоксин Pseudomonas, интерферон-α, интерферон-γ, JUNOVAN™ или МЕРАСТ™ (мифамуртид), лонафарниб, 5,10-метилентетрагидрофолат, милтефозин (гексадецилфосфохолин), NEOVASTAT® (AE-941), NEUTREXIN® (триметрексат глюкуронат), NIPENT® (пентостатин), ONCONASE® (фермент-рибонуклеаза), ONCOPHAGE® (средство для лечения, представляющее собой вакцину против меланомы), ONCOVAX® (вакцина на основе IL-2), ORATHECIN™ (рубитекан), OSIDEM® (клеточное лекарственное средство на основе антител), OVAREX® MAб (моноклональное антитело мыши), паклитаксел, PANDIMEX™ (агликоновые сапонины из женьшеня, содержащие 20(S)-протопанаксодиол (aPPD) и 20(S)-протопанаксотриол (aPPT)), панитумумаб, PANKVAC®-VF (экспериментальная противораковая вакцина), пэгаспаргаза, PEG-интерферон A, феноксодиол, прокарбазин, ребимастат, REMOVAB® (катумаксомаб), REVLIMID® (леналидомид), RSR13 (эфапроксирал), SOMATULINE® LA (ланреотид), SORIATANE® (ацитретин), стауроспорин (Streptomyces staurospores), талабостат (PT100), TARGRETIN® (бексаротен), TAXOPREXIN® (DHA-паклитаксел), TELCYTA® (канфосфамид, TLK286), темилифен, TEMODAR® (темозоломид), темилифен, талидомид, THERATOPE® (STn-KLH), тимитак (2-амино-3,4-дигидро-6-метил-4-оксо-5-(4-пиридилтио)хиназолина дигидрохлорид), TNFERADE™ (аденовектор: ДНК-носитель, содержащий ген фактора некроза опухоли-α), TRACLEER® или ZAVESCA® (босентан), третиноин (ретин-A), тетрандрин, TRISENOX® (триоксид мышьяка), VIRULIZIN®, украин (производное алкалоидов из растения чистотела большого), витаксин (антитело к alphavbeta3), XCYTRIN® (мотексафин гадолиния), XINLAY™ (атрасентан), XYOTAX™ (паклитаксела полиглумекс), YONDELIS® (трабектедин), ZD-6126, ZINECARD® (дексэзаксан), ZOMETA® (золедроновая кислота), зорубицин и т.п.

В одном варианте осуществления раскрыт способ лечения рака, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения рака легкого, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения EGFR T790M+ NSCLC, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения PTEN NSCLC, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для лечения рака у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли и ii) осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для лечения рака легкого у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли и ii) осимертиниба или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для лечения EGFR T790M+ NSCLC у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли и

В одном варианте осуществления раскрыт дендимер формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для лечения рака молочной железы у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) дендимера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли и ii) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозиды и/или карбоплатина).

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения рака у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозид и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения солидных опухолей у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозид и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения NSCLC у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозиды и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения SCLC у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозиды и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения рака молочной железы у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозид и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления раскрыто средство для химиотерапии (например, топотекан, пеметревед, паклитаксел, этопозид и/или карбоплатин) для лечения рака яичника у субъекта, где указанное лечение предусматривает отдельное, последовательное или одновременное введение указанному субъекту i) средства для химиотерапии (например, топотекана, пеметреведа, паклитаксела, этопозид и/или карбоплатина) и ii) дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте раскрыты способы ингибирования Bcl-2 и/или Bcl-XL у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту эффективного количества дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте раскрыт дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в ингибировании Bcl-2 и/или Bcl-XL.

В одном аспекте раскрыто применение дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для ингибирования Bcl-2 и/или Bcl-XL.

В одном аспекте раскрыты фармацевтические композиции, содержащие дендимер формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в ингибировании Bcl-2 и/или Bcl-XL.

Термин "Vcl-2" относится к белку 2 В-клеточной лимфомы, а термин "Vcl-XL" относится к сверх-

большому белку В-клеточной лимфомы, антиапоптозным представителям семейства белков Bcl-2.

Выражение "эффективное количество" предусматривает количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли или второго противоракового средства, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта, например снижение или ингибирование активности фермента или белка, связанного с Bcl-2 и/или Bcl-XL или раком; облегчение симптомов рака или замедление или отсрочку прогрессирования рака. В некоторых вариантах осуществления выражение "эффективное количество" предусматривает количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли или второго противоракового средства, которое при введении субъекту является эффективным по меньшей мере для частичного уменьшения, подавления, и/или облегчения симптомов рака или ингибирования Bcl-2 и/или Bcl-XL, и/или уменьшения или подавления роста опухоли или пролиферации раковых клеток у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 300 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 60 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество раскрытого дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера (I), (II), (III), (IV) или (V) может составлять от приблизительно 20 до приблизительно 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество дендримера формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемой соли может составлять приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг, приблизительно 100 мг/кг, приблизительно 300 мг/кг или приблизительно 145 мг/кг.

Дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть разработаны для высвобождения активного средства из поверхностных функциональных групп дендримера. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль высвобождают эффективное количество соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 1 до приблизительно 150 мг/кг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 1 до приблизительно 90 мг/кг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 1 до приблизительно 25 мг/кг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 1 до приблизительно 15 мг/кг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг соединения А. В некоторых вариантах осуществления дендример формулы (I), (II), (III), (IV) или (V) или его фармацевтически приемлемая соль могут высвобождать приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 17 мг/кг, приблизительно 18 мг/кг, приблизительно 19 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 21 мг/кг, приблизительно 22 мг/кг, приблизительно 23 мг/кг, приблизительно 24 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 26 мг/кг, приблизительно 27 мг/кг, приблизительно 28 мг/кг, приблизительно 29 мг/кг, приблизительно 87 мг/кг или приблизительно 145 мг/кг соединения А.

В некоторых вариантах осуществления соединение А может характеризоваться периодом полувывсвобождения (например, временем, которое требуется для высвобождения из дендримера половины количества соединения А) от приблизительно 1 до приблизительно 360 ч. В некоторых вариантах осуществления соединения А может характеризоваться периодом полувывсвобождения от приблизительно 2 до приблизительно 72 ч. В некоторых вариантах осуществления соединения А может характеризоваться периодом полувывсвобождения от приблизительно 5 до приблизительно 36 ч. В некоторых вариантах осуществления соединения А может характеризоваться периодом полувывсвобождения от приблизительно

но 12 до приблизительно 30 ч. В некоторых вариантах осуществления соединение А может характеризоваться периодом полувывсвобождения от приблизительно 16 до приблизительно 30 ч. В некоторых вариантах осуществления период полувывсвобождения определяют при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления период полувывсвобождения определяют при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C. Специалист в данной области сможет определить скорость высвобождения соединения А *in vitro*, следуя протоколам, изложенным в примерах 11, 12 и 14.

В некоторых вариантах осуществления период полувывсвобождения *in vitro* определяют при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C, как описано в примере 11. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 20 до приблизительно 80% соединения А высвобождается приблизительно через 6 ч при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 80% соединения А высвобождается приблизительно через 6,5 ч при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 50% соединения А высвобождается приблизительно через 6,5 ч при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 6% соединения А высвобождается приблизительно через 6,5 ч при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 4% соединения А высвобождается приблизительно через 6,5 ч при pH 7,4 в PBS буфере с 10% DMA при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 24% соединения А высвобождается приблизительно через 6 ч при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA при 37°C.

В некоторых вариантах осуществления период полувывсвобождения *in vitro* определяют при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C, как описано в примере 12. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 3 до приблизительно 80% соединения А высвобождается приблизительно через 7 дней при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 63% соединения А высвобождается приблизительно через 7 дней при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 30% соединения А высвобождается приблизительно через 7 дней при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 3,6% соединения А высвобождается приблизительно через 7 дней при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 81% соединения А высвобождается приблизительно через 7 дней при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте при 37°C.

В некоторых вариантах осуществления, растворимость дендримера можно измерять, следуя протоколам, изложенным в примерах 15 и 16. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA составляет от приблизительно 120 до 160 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA составляет приблизительно 125 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA составляет приблизительно 153 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA составляет приблизительно 142 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 7,4 в PBS-буфере с 10% DMA составляет приблизительно 158 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте составляет от приблизительно 120 до 166 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте составляет приблизительно 162 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте составляет приблизительно 141 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте составляет приблизительно 157 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте составляет приблизительно 121 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера в буфере Мак-Илвейна при pH 4 составляет приблизительно 0,189 г/г. В некоторых вариантах осуществления растворимость дендримера в буфере Мак-Илвейна при pH 5 составляет приблизительно 0,224 г/г.

Термин "субъект" предусматривает теплокровных млекопитающих, например, приматов, собак, кошек, кроликов, крыс и мышей. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой примата, например, человека. В некоторых вариантах субъект страдает от рака или иммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении (например, субъект будет получать биологическую или медицинскую пользу от лечения). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от рака. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от рака, положительного по EGFR-М (например, немелкоклеточного рака легкого). В некоторых вариантах осуществления рак, положительный по EGFR-М, характеризуется преимущественно T790М-положительной мутацией. В некоторых вариантах осуществления рак, положительный по EGFR-М, характеризуется преимущественно T790М-отрицательной мутацией. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от гематологического (например, лимфом, лейкозов) или солидного злокачественного новообразования, такого как, например, острая лимфобластная лимфома (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, (SLL), хронический миелоген-

ный лейкоз (СМL), острый моноцитарный лейкоз (АМL), множественная миелома, лимфома из клеток мантийной зоны, диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBcl), лимфома Беркитта, неходжкинская лимфома, фолликулярная лимфома и солидные опухоли, например немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак молочной железы, нейробластома, рак предстательной железы, меланома, рак поджелудочной железы, рак матки, рак эндометрия и рак толстой кишки.

Выражения "ингибировать", "ингибирование" или "осуществление ингибирования" предусматривают снижение биологической активности или процесса относительно их активности на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления дендримеры формулы (I), (II), (III) или (IV) ингибируют Bcl-2 и/или Bcl-XL.

Выражения "лечение", "осуществление лечения" и "лечение" предусматривают снижение или ингибирование активности фермента или белка, связанного с Bcl-2 и/или Bcl-XL или раком, у субъекта, облегчение одного или нескольких симптомов рака у субъекта или замедление или отсрочку прогрессирования рака у субъекта. Выражения "лечение", "осуществление лечения" и "лечение" также предусматривают уменьшение или ингибирование роста опухоли или пролиферации раковых клеток у субъекта.

Примеры

Аспекты настоящего изобретения могут быть дополнительно определены с помощью ссылки на приведенные далее неограничивающие примеры, в которых подробно описано получение определенных соединений и промежуточных соединений по настоящему изобретению, а также способы применения соединений по настоящему изобретению. Специалистам в данной области будет очевидно, что на практике могут быть осуществлены многие модификации, как материалов, так и способов, без отступления от объема настоящего изобретения. Если не указано иное:

(i) все синтезы проводили при температуре окружающей среды, т.е. в диапазоне от 17 до 25°C, и в атмосфере инертного газа, такого как азот, если не указано иное;

(ii) процедуры выпаривания проводили посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении с применением оборудования Buchi или Heidolph;

(iii) лиофилизацию проводили с применением системы сублимационной сушки Labconco FreeZone 6 Plus;

(iv) процедуры очистки посредством эксклюзионной хроматографии проводили с применением колонок, заполненных гранулами Sephadex LH-20;

(v) препаративную хроматографию проводили на системе Gilson Prep GX-271 со сбором, запускаемым УФ-датчиком, с применением колонки Waters XBridge BEH C18 (5 мкм, 30×150 мм);

(vi) процедуры очистки посредством ультрафильтрации проводили с применением приводной системы шестеренчатого насоса Cole-Parmer, присоединенной к мембраной кассете (Merck Millipore Pellicon 3, 0,11 м², 10 кДа).

(vii) аналитическую хроматографию проводили на сепарационном модуле Waters Alliance 2695 с PDA-обнаружением;

(viii) значения выхода, если они приводятся, необязательно являются максимально достигаемыми;

(ix) обычно структуры конечных продуктов дендримеров подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии; значения химического сдвига в ¹H и ¹⁹F ЯМР измеряли по дельта-шкале, [спектры протонного магнитного резонанса определяли с помощью устройства Bruker Avance 300 (300 МГц)]; измерения проводили при температуре окружающей среды, если не указано иное; при ¹H ЯМР применяли пик остаточного растворителя как внутренний стандарт и использовали следующие сокращения: s, синглет; d, дублет; t, триплет; q, квартет; m, мультиплет; dd, дублет дублетов; ddd, дублет дублета дублетов; dt, дублет триплетов; br s, широкий синглет;

(x) обычно конечные продукты, представляющие собой дендримеры, также характеризовали посредством HPLC с применением сепарационного модуля Waters Alliance 2695 с PDA-обнаружением, присоединенного либо к колонке Waters XBridge C8 (3,5 мкм, 3×100 мм), либо к колонке Phenomenex Aeris C8 (3,6 мкм, 2,1×100 мм);

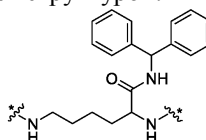
(xi) чистоту промежуточного соединения оценивали с помощью масс-спектрологии после жидкостной хроматографии (LC-MS) с применением Waters UPLC, оснащенной масс-спектрометром Waters SQ (температура колонки 40°C, УФ = 220-300 или 190-400 нм, масс-спектрометрия = ESI с переключением режима положительной/отрицательной ионизации), при расходе 1 мл/мин с применением системы растворителей от 97% А + 3% В до 3% А + 97% В в течение 1,50 мин (общее время анализа с уравниванием обратно до исходных условий и т.д. - 1,70 мин), где А = 0,1% муравьиная кислота или 0,05% трифторуксусная кислота в воде (для кислотной обработки) или 0,1% гидроксид аммония в воде (для основной обработки) и В = ацетонитрил. В случае кислотного анализа применяли колонку Waters Acquity HSS T3 (1,8 мкм, 2,1×50 мм), в случае основного анализа применяли колонку Waters Acquity BEH C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм). В качестве альтернативы UPLC проводили с применением Waters UPLC, оснащенной масс-спектрометром Waters SQ (температура колонки 30°C, УФ = 210-400 нм, масс-спектрометр = ESI с переключением режима положительной/отрицательной ионизации), при расходе 1 мл/мин с применением градиента растворителя от 2 до 98% В в течение 1,5 мин (общее время анализа с уравнива-

нием обратно до исходных условий - 2 мин), где A = 0,1% муравьиная кислота в воде и B = 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле (для кислотной обработки) или A = 0,1% гидроксид аммония в воде и B = ацетонитрил (для основной обработки). Для кислотного анализа применяли колонку Waters Acquity HSS T3 (1,8 мкм, 2,1×30 мм), для основного анализа применяли колонку Waters Acquity BEH C18 (1,7 мкм, 2,1×30 мм); приведенный молекулярный ион соответствует $[M+H]^+$, если не указано иное; для молекул с несколькими изотопами (Br, Cl и т.д.) приведенное значение представляет собой значение, полученное с наибольшей интенсивностью, если не указано иное;

(xii) были использованы следующие сокращения:

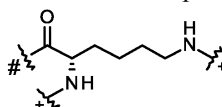
ACN	ацетонитрил
BHA	бензгидриламин
BOC	<i>tert</i> -бутилоксикарбонил
CoA	сертификат соответствия
DGA	дигликолевая кислота
DIPEA	диизопропилэтиламин
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
FBA	4-фторбензойная кислота
Glu	глутаровая кислота
HP- β -CD	гидроксипропил-бета-циклодекстрин
MeOH	метанол
MIDA	метилиминодиуксусная кислота
MSA	метансульфоновая кислота
MTBE	метил-трет-бутиловый эфир
MW	молекулярная масса
NMM	N-метилморфолин
PBS	забуференный фосфатом физиологический раствор
PEG	полиэтиленгликоль
PTFE	политетрафторэтилен
PyBOP	бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат
QS/qs	сколько нужно (количество, которое необходимо)
SBE- β -CD	сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина (Captisol®)
TDA	тиодигликолевая кислота
TFA	трифторуксусная кислота
WFI	вода для инъекций, WFI

Применяемый в примерах термин "BHALys" относится к 2,6-диамино-N-бензгидрилгексанамиду, связанному с лизином. BHA характеризуется структурой:



где * обозначает ковалентную связь со структурными блоками в виде лизина.

Термин "Lys" относится к структурным звеньям дендримера и характеризуется структурой:

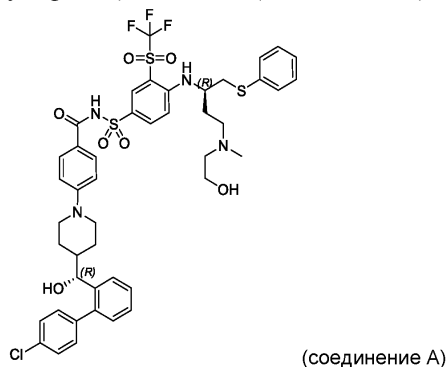


в которой # обозначает ковалентную связь с аминным фрагментом BHALys или аминокислотным фрагментом структурного звена Lys;

+ обозначает ковалентную связь с карбонильным фрагментом структурного звена Lys или ковалентную связь с PEG или линкером, присоединенным к активному средству.

Для удобства в название дендримера включено только поверхностное поколение структурных звеньев в дендримерах из примеров. Кроме того, символ ‡ в названии относится к теоретическому числу ϵ -аминогрупп, доступных для конъюгации с PEG, а символ † в названии относится к теоретическому числу α -аминогрупп на дендримере, доступных для конъюгации с линкером, присоединенным к актив-

Пример 1. Физико-химические свойства 4-(4-((R)-(4'-хлорбифенил-2-ил)(гидроксиметил)-пиперидин-1-ил)-N-(4-((R)-4-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)-1-(фенилтио)бутан-2-иламино)-3-(трифтометилсульфонил)фенилсульфонил)бензамида (соединение А)



Получение соединения А, формы В.

Растворимость.

Растворимость соединения А (форма В) определяли в воде и пропиленгликоле. Растворимость определяли с применением способа встряхиваемой колбы, оставляя лекарственное вещество уравниваться при комнатной температуре в течение 24 ч, при этом наличие некоторого количества осадка во флаконах указывало на присутствие избытка лекарственного вещества. Растворы центрифугировали с применением ультрацентрифуги в течение 30 мин при 40000 об/мин, супернатант переносили в новую центрифужную пробирку и центрифугировали в течение дополнительных 30 мин при 40000 об/мин. Супернатант на основе пропиленгликоля затем анализировали с применением способа UV-HPLC. Водный супернатант перед проведением анализа подвергали ультрацентрифугированию в третий раз. Результаты приведены в табл. 1.

Данные о растворимости кристаллической формы В соединения А

Растворитель	Конечный pH	Растворимость (мг/мл)
Вода	8,7	<1мкг/мл*
Пропиленгликоль	-	6,12 мг/мл

1) растворимость является крайне низкой, и при переносе растворов из центрифужных флаконов в пипетки/флаконы для LC и т.п. вполне вероятно, что некоторое количество соединения А теряется вследствие связывания со стеклянными/пластиковыми компонентами;

- 38 -

ции скорость разложения под действием света становится значимой. Хотя предпринимались попытки сведения к минимуму количества света, воздействию которого подвергался водный раствор, незначительное количество светового воздействия могло в значительной степени повлиять на показатель растворимости.

LogD.

Липофильность (LogD) соединения А измеряли с применением методики встряхиваемой колбы с октанолом/водой. Применяемый водный раствор представлял собой 10 мМ натрий-фосфатный буфер с рН, доведенным до 7,4. В качестве органического разделяющего слоя применяли октанол. Способ был валидирован для log D в диапазоне от -2 до 5,0. Измеренное значение LogD для соединения А составляло >3,5, что указывает на то, что это высоколипофильная молекула.

Проникающая способность с использованием Сасо-2.

Клеточные линии Сасо-2 происходят из колоректальной аденокарциномы человека. В случае посева с применением общепринятых условий культивирования клеток дифференциация и образование плотных монослоев клеток (на пористых поликарбонатных мембранах) делают клетки Сасо-2 похожими на кишечные (всасывающие) энтероциты. Клетки Сасо-2 экспрессируют целый ряд эффлюксных транспортеров, включая белок 1 множественной лекарственной устойчивости человека (hMDR1), белок 2, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью человека (hMRP2), и белок устойчивости рака молочной железы человека (hBCRP). Для оценки проникающей способности и выведения новых химических соединений клетки Сасо-2 применяли в формате 96-луночного планшета. Данные получали посредством стандартной LC-MS/MS, однако никаких значений не получили. По-видимому, плохое обнаружение обусловлено ограничениями растворимости соединения А.

Связывание с белками плазмы крови.

Связывание с белками у соединения А (приготовленного в виде исходных растворов в DMSO и введенного в плазму крови при номинальных концентрациях инкубации 0,1, 1, 10 и 100 мкмоль/л) оценивали в объединенной замороженной плазме крови, полученной от самцов мышей CD-1, самцов крыс Han Wistar, самок новозеландских белых кроликов, кобелей породы "Бигль" и людей-мужчин, в трех повторностях с применением метода равновесного диализа на устройстве RED (Waters NJ et al., Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding, Journal of Pharmaceutical Sciences; 2008; Volume 97; Issue 10; Pages 4586-4595, 2008). Инкубации проводили на протяжении времени уравнивания, составляющего 30 ч, при 37°C. Анализ образцов проводили с помощью HPLC-MS/MS и использовали внутренний стандарт соединения А [¹³C, ²H₇] с применением следующего биоаналитического способа.

Аппарат для LC-MS/MS.

UHPLC: Shimadzu CC-30A.

Устройство для MS/MS: API 4000 (AB Sciex, США).

Условия LC-MS/MS.

1. Условия хроматографирования.

Колонка: Phenomenex Kinetex 1,7 мкм C18 (2,1×30 мм).

Подвижная фаза: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле (B) и 0,1% муравьиная кислота в воде (A).

Таблица 2

Градиент муравьиной кислоты в воде

Время (мин)	0	0,5	1,2	2,0	2,1	2,5
% B	5	5	100	100	5	5

Скорость элюирования: 0,6 мл/мин.

Температура колонки: комнатная температура.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Условия масс-спектрометрии.

Источник ионов: Turbo spray.

Режим ионизации: ESI.

Тип сканирования: MRM.

Другие параметры.

Таблица 3

	Q1	Q3	DP (B)	EP (B)	CE (B)	CXP (B)
Соединение А	945,2	404,3	120	10	55	12
[¹³ C, ² H ₇] соединение А	953,2	404,3	120	10	55	12

Было обнаружено, что при концентрации соединения А 100 мкмоль/л процентное содержание несвязанного соединения А у мыши, кролика и человека составляло 0,00235, 0,00153 и 0,00196% соответственно. При концентрации соединения А 100 мкмоль/л % несвязанного соединения А в плазме крови

крысы и собаки составлял <0,001%, в то же время выявляемые уровни соединения А наблюдали в буферном компоненте, но они не поддавались количественному определению (<1 нмоль/л). При концентрациях соединения А, составляющих 0,1, 1 и 10 мкмоль/л, % несвязанного соединения А нельзя было определить ни у одного из видов, поскольку концентрации в буферном компоненте не поддавались количественному определению (<1 нмоль/л). Эти данные свидетельствуют о том, что соединение А чрезвычайно сильно связывается с белками плазмы крови мыши, крысы, кролика, собаки и человека.

Пример 2. Получение составов на основе соединения А.

Композиции полученных составов приведены в табл. 4 (объем 10 мл) и табл. 5 (большой объем, а именно объем 500 и 1200 мл). Указанные концентрации представляют собой концентрацию соединения А в каждом из составов.

Таблица 4

Примеры композиций составов для объема 10 мл

Ингредиенты	30% вес/объем HP- β-CD pH 4 (1 мг/мл)	30% вес/объем HP-β-CD pH 4 (0,4 мг/мл)	5% вес/объем Cremophor EL pH 4 (2 мг/мл)	0,5% вес/объем Tween 80 pH 9 (1 мг/мл)	0,5% вес/объем Tween 80 pH 9 (0,4 мг/мл)	10,6% вес/объем Captisol pH 9 (1 мг/мл)	10,2% вес/объем Captisol pH 9 (0,4 мг/мл)
WFI	qs до 10 мл	qs до 10 мл	qs до 10 мл	qs до 10 мл (с физиологи- ческим раствором)	qs до 10 мл (с физиологи- ческим раствором)	qs до 10 мл	qs до 10 мл
HP-β-CD (вспомогательное вещество)	3,0 г	3,0 г	-	-	-	-	-
Captisol (вспомогательное вещество)	-	-	-	-	-	1,06g	1,02g
Cremophor EL (вспомогательное вещество)	-	-	0,5 г	-	-	-	-
Tween 80 (вспомогательное вещество)	-	-	-	0,05 г	0,05 г	-	-

PEG 400 (вспомогательное вещество)	-	-	1,5 мл	-	-	-	-
Соединение А (активное средство)	0,01 г	0,004 г	0,02 г	0,01 г	0,004 г	0,01 г	0,004 г
1 М меглюмин (модификатор рН)	-	-	-	0,04 мл (4 молярн. экв. относительно активного средства)	0,04 мл (4 молярн. экв. относительно активного средства)	0,02 мл (2 молярн. экв. относительно активного средства)	0,02 мл (2 молярн. экв. относительно активного средства)
1 М MSA (модификатор рН)	достаточное количество для модификации рН до 4	достаточное количество для модификации рН до 4	0,024 мл (и достаточное количество для модификации конечного рН до 4)	-	-	-	-
1 М HCl (модификатор рН)	-	-	-	достаточное количество для модификации рН до 9	достаточное количество для модификации рН до 9	достаточное количество для модификации рН до 9	достаточное количество для модификации рН до 9
1 М NaOH (модификатор рН)	достаточное количество для модификации рН до 4 (если потребуется)	достаточное количество для модификации рН до 4 (если потребуется)	достаточное количество для модификации рН до 4 (если потребуется)	-	-	-	-
Этанол (сорастворитель)	-	-	0,5 мл	-	-	-	-

Способ получения составов на основе 30% вес./об. HP-β-CD (применяемых в качестве "среды-носителя 1" в примере 3).

Получали среду-носитель, содержащую 30% вес./об. HP-β-CD. 3 г HP-β-CD (Roquette Kleptose, степень чистоты соответствует парентеральному введению) отвешивали в 10 мл мерную колбу, добавляли 8 мл WFI и перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. После растворения объем доводили до 10 мл с помощью WFI.

Соответствующее количество соединения А отвешивали в 10 мл мерную колбу. Затем добавляли 8 мл среды-носителя, содержащей 30% вес./об. HP-β-CD, и состав перемешивали. Добавляли по каплям 1 М MSA, пока рН не снижался до приблизительно 2. Затем состав перемешивали, пока соединение полностью не растворилось. рН измеряли и доводили до рН 4, добавляя по каплям 1 М MSA или NaOH. Затем состав перемешивали, чтобы гарантировать получение прозрачного раствора (с вероятной мутностью). Объем затем доводили до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 30% вес./об. HP-β-CD, и перемешивали. Конечный рН измеряли и регистрировали и состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр

перед введением. Составы с другими концентрациями получали путем разбавления соединения А в 30% вес./об. HP- β -CD с помощью соответствующего количества среды-носителя, содержащей 30% вес./об. HP- β -CD.

Способ получения состава на основе 10,6% вес./об. Captisol (применяемого в качестве "среды-носителя 2" в примере 3).

Получали среду-носитель, содержащую 20% вес./об. Captisol. 2 г Captisol (степень чистоты соответствует исследовательскому применению, лиганд) отвешивали в 10 мл мерную колбу, добавляли 8 мл WFI и перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. После растворения объем доводили до 10 мл с помощью WFI. Среду-носитель, содержащую 7,5% вес./об. Captisol, получали путем разбавления 3,75 мл среды-носителя, содержащей 20% вес./об. Captisol, до 10 мл с помощью WFI. Среду-носитель, содержащую 10,0% вес./об. Captisol, получали путем разбавления 5 мл среды-носителя, содержащей 20% вес./об. Captisol, до 10 мл с помощью WFI.

Готовили исходный 4 мг/мл раствор соединения А в 20% вес./об. Captisol, pH 9. Отвешивали 0,04 г соединения А в мерную колбу. Затем добавляли 8 мл среды-носителя, содержащей 20% вес./об. Captisol, и состав перемешивали. Добавляли соответствующий объем 1 М меглюмина. Затем состав перемешивали, пока соединение полностью не растворилось. Затем pH измеряли и доводили до pH 9, добавляя по каплям 1 М HCl. Затем объем доводили до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 20% вес./об. Captisol, и перемешивали. Конечный pH измеряли и регистрировали и состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр.

1 мг/мл раствор соединения А в составе на основе 10,6% вес./об. Captisol (применяемом в примере 3) готовили путем разбавления исходного 4 мг/мл раствора соединения А в 2,5 мл 20% вес./об. Captisol до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 7,5% вес./об. Captisol.

Способ получения состава на основе 0,5% вес./об. Tween 80 (применяемого в качестве "среды-носителя 3" в примере 3).

Получали среду-носитель, содержащую 5% вес./об. Tween 80. 0,5 г Tween 80 (высокой степени очистки, Fisher Scientific) отвешивали в 10 мл мерную колбу, добавляли 8 мл WFI и перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. После растворения объем доводили до 10 мл с помощью WFI. Среду-носитель, содержащую 0,5% вес./об. Tween 80, получали путем разбавления 1 мл среды-носителя, содержащей 5% вес./об. Tween, до 10 мл с помощью физиологического раствора.

Получали исходный 10 мг/мл раствор соединения А в 5% вес./об. Tween 80, pH 9. Отвешивали 0,1 г соединения А в мерную колбу. Затем добавляли 8 мл среды-носителя, содержащей 5% вес./об. Tween 80, и состав перемешивали. Добавляли соответствующий объем 1 М меглюмина. Затем состав перемешивали, пока соединение полностью не растворилось. Затем pH измеряли и доводили до pH 9, добавляя по каплям 1 М HCl. Затем объем доводили до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 5% вес./об. Tween 80, и перемешивали. Конечный pH измеряли и регистрировали и состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр.

1 мг/мл раствор соединения А в составе на основе 0,5% вес./об. Tween готовили путем разбавления исходного 10 мг/мл раствора соединения А в 1 мл 5% вес./об. Tween до 10 мл с помощью физиологического раствора. Получение 0,4 мг/мл раствора соединения А в 0,5% вес./об. Tween осуществляли путем разбавления 1 мг/мл раствора соединения А в 4 мл 0,5% вес./об. Tween до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 0,5% вес./об. Tween 80.

Способ получения состава на основе 5% вес./об. Cremophor EL (применяемого в качестве "среды-носителя 4" в примере 3).

Получали среду-носитель, содержащую 20% вес./об. Cremophor. 2 г Cremophor EL (Kolliphor EL®, BASF) (вязкая жидкость) отвешивали в 10 мл мерную колбу. Затем добавляли 5 мл WFI и обрабатывали ультразвуком или перемешивали для растворения. После растворения объем доводили до нужного значения с помощью WFI.

Отвешивали 0,02 г соединения А в 10 мл мерную колбу. Добавляли 0,5 мл этанола, 1,5 мл PEG 400 (Fischer Scientific) и 0,024 мл 1 М MSA. Затем состав перемешивали, пока лекарственное средство полностью не растворилось. pH измеряли и доводили, в случае необходимости, до pH 4,0 с помощью концентрированного 1 М NaOH или 1 М MSA. Добавляли 2,5 мл среды-носителя, содержащей 20% вес./об. Cremophor, и затем объем доводили до 10 мл с помощью WFI с получением прозрачного раствора. Состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр перед введением.

Способ получения состава на основе 10,2% вес./об. Captisol.

Приготовление 0,4 мг/мл раствора соединения А в 10,2% вес./об. Captisol осуществляли путем разбавления 1 мг/мл раствора соединения А в 4 мл состава на основе 10,6% вес./об. Captisol (способ получения см. в предыдущем разделе) до 10 мл с помощью среды-носителя, содержащей 10,0% вес./об. Captisol.

Таблица 5

Композиции составов для большого объема

Ингредиенты	Состав на основе 28% вес/объем HP-β-CD pH 9,5 (5 г/мл раствор соединения А)	Состав на основе 14% вес/объем Captisol pH 9,5 (0,5 мг/мл раствор соединения А)
WFI	qs до 500 мл	qs до 1200 мл
HP-β-CD (вспомогательное вещество)	140,0 г	-
Captisol (вспомогательное вещество)	-	168,0 г
Соединение А (активное средство)	2,5 г	0,60 г
1 М меглюмин (модификатор pH)	5,42 мл (2 молярных эквивалента относительно активного средства) и достаточное количество для модификации конечного pH до 9,5	1,30 мл (2 молярных эквивалента активного вещества) и достаточное количество для модификации конечного pH до 9,5
1 М HCl (модификатор pH)	достаточное количество для модификации pH до 9,5	достаточное количество для модификации pH до 9,5

Способ получения состава на основе 28% вес./об. HP-β-CD.

Получение проводили в чистом помещении и применяли чистое, стерильное оборудование. Получали среду-носитель, содержащую 28% вес./об. HP-β-CD. Отвешивали 145,60 г HP-β-CD в 2 л химический стакан, добавляли 412,88 г WFI и перемешивали до полного растворения HP-β-CD.

В 1 л химический стакан добавляли 279,2 г 28% вес./об. HP-β-CD. Вслед за этим добавляли при перемешивании 5,689 г 1 М меглюмина, с последующим добавлением при перемешивании 2,50 г соединения А. Суспензию гомогенизировали в течение 30 мин. Затем головку гомогенизатора промывали с помощью 28% вес./об. HP-β-CD и смывы добавляли в 1 л химический стакан с получением ~95% от конечного целевого объема. Обеспечивали защиту суспензии от света и ее перемешивали в течение ночи с получением желтого, слегка мутного раствора. pH мутного раствора доводили до 9,5 с применением 1 М меглюмина, объем раствора доводили до целевого с применением среды-носителя, содержащей 28% вес./об. HP-β-CD, и перемешивали в течение 30 мин. Конечный pH измеряли и регистрировали, состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр перед тем, как заполнить им чистые, стерильные флаконы, которые закрывали пробками и обжимали.

Способ получения состава на основе 14% вес./об. Captisol.

Получение проводили в чистом помещении и применяли чистое, стерильное оборудование. Вначале готовили концентрированную среду-носитель, содержащую 42% вес./об. Captisol, чтобы облегчить растворение соединения А (позже при получении состав добавляли с помощью WFI с получением конечного состава на основе 14% вес./об. Captisol). В 3 л химический стакан отвешивали 579,86 г WFI, добавляли при перемешивании 352,94 г Captisol и затем смесь перемешивали в условиях большой вихревой воронки до полного растворения Captisol.

В 600 л химический стакан добавляли 233,2 г 42% вес./об. Captisol. Вслед за этим добавляли при перемешивании 1,365 г 1 М меглюмина, с последующим добавлением при перемешивании 0,60 г соединения А. Суспензию гомогенизировали в течение 30 мин с получением желтого, слегка мутного раствора. Головку гомогенизатора промывали с помощью 42% вес./об. Captisol. Гомогенизированный раствор и смывы переносили в 2 л химический стакан и доводили до общего объема 400 мл с помощью 42% вес./об. Captisol. Обеспечивали защиту раствора от света и перемешивали его в течение ночи. Слегка мутный раствор разбавляли с помощью 740 г WFI до ~95% от конечного целевого объема и перемешивали в течение 30 мин. pH раствора доводили до 9,5 с применением 1 М меглюмина, объем раствора доводили до целевого с применением WFI и перемешивали в течение 30 мин. Конечный pH измеряли и регистрировали, состав фильтровали через 0,22 мкм фильтр перед тем, как заполнить им чистые, стерильные флаконы, которые закрывали пробками и обжимали.

Стабильность составов на основе Captisol и HP-β-CD.

Оценивали показатели физической стабильности состава на основе 0,5 мг/мл соединения А/14% вес./об. Captisol и состава на основе 5,0 мг/мл соединения А/28% вес./об. HP-β-CD. В каждом составе в пределах 24 ч хранения при температуре окружающей среды формировалось очень небольшое количество осадка, едва видимого невооруженным глазом. В случае состава на основе Captisol отмечалось, что осадок формировался быстро при нарушении системы состава (например, при фильтрации), но количество осадка не продолжало расти с большой скоростью в случае хранения состава при 5°C и 25°C в течение 6 месяцев.

Данные о химической стабильности указывают на то, что состав на основе Captisol необходимо хранить при 5°C или в замороженном состоянии, чтобы обеспечить приемлемый срок годности (>6 меся-

цев) для клинических исследований.

Из-за низкой растворимости соединения А в водных средах-носителях для солюбилизации доз соединения А, которые необходимы для проведения исследований по клинической безопасности, в дополнение к высокому рН и большому объему инфузий, потребуется высокое содержание Captisol или HP-β-CD.

Пример 3. Исследование эффективности составов на основе соединения А в отношении ксенотрансплантата.

Составы, применяемые для исследования эффективности в отношении ксенотрансплантата, получали в соответствии с процедурами из примера 2 выше.

Оценка эффективности соединения А на ксенотрансплантатной модели острого лимфобластного лейкоза (ALL) RS4;11 у мышей.

Клетки острого лимфобластного лейкоза человека (RS4;11) применяли для тестирования активности соединения А в различных составах (фиг. 3А). Клетки RS4;11 вводили посредством подкожной инъекции в правый бок самок мышей CB-17/ICr-Prkdcscid/IcrIcoCrI SCID (Charles River Laboratories) из расчета 5×10^6 клеток/мышь. Когда опухоли достигали целевого размера 300-400 мм³, мышей рандомизировали в группы контроля со средой-носителем: средой-носителем 1 (30% HP-β-CD, рН 4), средой-носителем 2 (10,6% Captisol, рН 9), средой-носителем 3 (0,5% Tween, рН 9) или группы обработки соединением А (по 2 и 5 мг/кг, составленного в среде-носителе 1, 2 или 3). Дополнительно, в отдельном эксперименте исследовали активность соединения А в составе на основе Cremophor, среде-носителе 4 (фиг. 3В). Все составы вводили в виде однократного IV болюса. Для оценки эффективности объем опухоли измеряли дважды в неделю и рассчитывали следующим образом: объем опухоли = $(A \times B^2)/2$, где А и В - длина и ширина опухоли (в мм) соответственно, в течение вплоть до 4 недель после введения дозы.

Для оценки фармакодинамического (PD) ответа на однократную дозу (фиг. 4) в соответствующие моменты времени отбирали мышей, извлекали опухоли и половину опухоли обрабатывали и анализировали в отношении ответа в виде расщепления каспазы 3 (CC3), как маркера индукции апоптоза, с применением набора для ELISA, Pathscan от Cell Signaling. Для оценки воздействия на опухоль (PK) однократной дозы (фиг. 5) оставшуюся половину опухоли обрабатывали и измеряли концентрацию лекарственного средства.

Составы на основе Captisol и HP-β-CD показали статистически эквивалентные показатели эффективности на протяжении 33 дней. С другой стороны, состав на основе Tween 80 демонстрировал отсутствие эффективности/минимальную эффективность (фиг. 3А). Оба состава на основе Captisol и HP-β-CD показали аналогичное воздействие на опухоль через 6 и 24 ч (фиг. 5). Состав на основе HP-β-CD, однако, запускал клеточную гибель в большей степени, что измеряли по уровню ответа в виде расщепления каспазы 3, чем состав на основе Captisol (фиг. 4), хотя эффективность и воздействие оказались эквивалентными. Состав на основе Tween 80 показал меньшее воздействие на опухоль и отсутствие признака индукции расщепления каспазы 3. Подводя итог, следует отметить, что эффективность соединения А зависит от присутствия циклодекстрина, либо HP-β-CD, либо Captisol. С другими средами-носителями наблюдали сниженную эффективность (например, Tween или Cremophor).

Оценка эффективности соединения А (HP-β-CD) при различной длительности инфузии на ксенотрансплантатной модели острого лимфобластного лейкоза RS4;11 у крыс.

Крысам Rag2^{-/-}, приобретенным у (SAGE), инокулировали RS4;11 (10×10^6 клеток/крыса). Когда опухоли вырастали примерно до 4500-6000 мм³, крыс рандомизировали в группу контроля со средой-носителем (30% HP-β-CD) или группу с 5 мг/кг соединения А в среде-носителе 1, вводимых в виде однократной IV инфузии в течение 30 мин (фиг. 6), и в группу контроля со средой-носителем (30% HP-β-CD) или группу с 5, 3 и 1 мг/кг соединения А в среде-носителе 1, вводимых в виде однократной IV в течение 5 ч (фиг. 7). Размеры опухоли измеряли дважды в неделю и рассчитывали следующим образом: объем опухоли = $(A \times B^2)/2$, где А и В - длина и ширина опухоли (в мм) соответственно.

Результаты показаны на фиг. 6 и 7. Соединение А в дозе 5 мг/кг при инфузии в течение 30 мин ингибировало рост опухоли через ~9 дней после однократной обработки по сравнению со средой-носителем. Сравнимую эффективность наблюдали при продлении инфузии до 5 ч. Подводя итог, следует отметить, что продление времени инфузии не влияло на активность соединения А в данном составе.

Пример 4. Получение и определение характеристик BHAlys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†.

Примечание: 32† относится к теоретическому числу ε-аминогрупп, доступных для замещения PEG_{~2000}. Фактическое среднее число PEG_{~2000}-групп, присоединенных к BHAlys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. в данном примере ниже раздел под названием "Определение характеристик BHAlys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†").

Получение BHAlys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†.

BHAlys[Boc]₂.

п-Нитрофенольный сложный эфир α,ε-(t-Boc)₂-(L)-лизина (2,787 кг, 5,96 моль) в виде твердого вещества добавляли к раствору аминодифенилметана (бензгидриламина) (0,99 кг, 5,4 моль) в безводном ацетонитриле (4,0 л), DMF (1,0 л) и триэтилаmine (1,09 кг) на протяжении 15 мин. Реакционную смесь

взбалтывали при 20°C в течение ночи. Затем реакционную смесь нагревали до 35°C и медленно на протяжении 30 мин добавляли водный раствор гидроксида натрия (0,5н., 10 л). Смесь перемешивали в течение дополнительных 30 мин, затем фильтровали. Твердый остаток на фильтре промывали водой и высушивали до постоянного веса (2,76 кг, 5,4 моль) с выходом 100%.

^1H ЯМР (CD_3OD) δ 7,3 (m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,2 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,08 (m, α -CH, 1H), 3,18 (br, ε -CH₂) и 2,99 (m, ε -CH₂, 2H), 1,7-1,2 (br, β,γ,δ -CH₂) и 1,43 (s, tBu) всего за β,γ,δ -CH₂ и tBu 25H Рассч. 24H.

MS (ESI +ve) найденное значение 534,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, рассч. для $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 534,7.

BHALys[HCl]₂.

Раствор концентрированной HCl (1,5 л) в метаноле (1,5 л) медленно добавляли, тремя порциями, к перемешиваемой суспензии BHALys[Boc]₂ (780,5 г, 1,52 моль) в метаноле (1,5 л) с такой скоростью, чтобы свести к минимуму чрезмерное вспенивание. Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 30 мин, затем концентрировали под вакуумом при 35°C. Остаток поглощали водой (3,4 л) и дважды концентрировали под вакуумом при 35°C, затем выдерживали под вакуумом в течение ночи. Затем добавляли ацетонитрил (3,4 л) и остаток снова концентрировали под вакуумом при 35°C с получением BHALys[HCl]₂ в виде белого твердого вещества (586 г, 1,52 моль) с выходом 100%.

^1H ЯМР (D_2O) δ 7,23 (br m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 5,99 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 3,92 (t, J=6,5 Гц, α -CH, 1H, Рассч. 1H), 2,71 (t, J=7,8 Гц, ε -CH₂, 2H, Рассч. 2H), 1,78 (m, β,γ,δ -CH₂, 2H), 1,47 (m, β,γ,δ -CH₂, 2H) и 1,17 (m, β,γ,δ -CH₂, 2H, всего 6H Рассч. 6H).

MS (ESI +ve) найденное значение 312 $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассч. для $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.

BHALys[Lys]₂[Boc]₄.

К суспензии BHALys[HCl]₂ (586 г, 1,52 ммоль) в безводном DMF (3,8 л) медленно добавляли триэтиламин (1,08 кг) для поддержания температуры реакции ниже 30°C. *p*-нитрофенольный сложный эфир α,ε -(t-Boc)₂-(L)-лизина (1,49 кг) в твердом состоянии добавляли медленно, тремя порциями и перемешивали в течение 2 ч между добавлениями. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Водный раствор гидроксида натрия (0,5 М, 17 л) медленно добавляли к хорошо перемешиваемой смеси и перемешивание продолжали до тех пор, пока твердый осадок не начинал свободно перемещаться. Осадок собирали посредством фильтрации и твердый остаток на фильтре хорошо промывали водой (2×4 л), затем ацетоном/водой (1:4, 2×4 л). Твердое вещество снова суспендировали с помощью воды, затем фильтровали и высушивали под вакуумом в течение ночи с получением BHALys[Lys]₂[Boc]₄ (1,51 кг) с выходом 100%.

^1H ЯМР (CD_3OD) δ 7,3 (m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,2 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,21 (m, α -CH), 4,02 (m, α -CH) и 3,93 (m, α -CH, всего 3H, Рассч. 3H), 3,15 (m, ε -CH₂) и 3,00 (m, ε -CH₂ всего 6H, Рассч. 6H), 1,7-1,3 (br, β,γ,δ -CH₂) и 1,43 (s, tBu) всего за β,γ,δ -CH₂ и tBu 57H, Рассч. 54H.

MS (ESI +ve) найденное значение 868,6 $[\text{M}-\text{Boc}]^+$; 990,7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, рассч. для $\text{C}_{51}\text{H}_{81}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 991,1.

BHALys[Lys]₂[HCl]₄.

BHALys[Lys]₂[Boc]₄ (1,41 кг, 1,46 моль) суспендировали в метаноле (1,7 л) при взбалтывании при 35°C. Хлористоводородную кислоту (1,7 л) смешивали с метанолом (1,7 л), полученный раствор добавляли четырьмя порциями к суспензии дендримера и оставляли перемешиваться в течение 30 мин. Растворитель удаляли при пониженном давлении и обрабатывали двумя последовательными порциями воды (3,5 л) с последующими двумя последовательными порциями ацетонитрила (4 л) с получением BHALys[Lys]₂[HCl]₄ (1,05 кг, 1,46 ммоль) с выходом 102%.

^1H ЯМР (D_2O) δ 7,4 (br m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,14 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,47 (t, J=7,5 Гц, α -CH, 1H), 4,04 (t, J=6,5 Гц, α -CH, 1H), 3,91 (t, J=6,8 Гц, α -CH, 1H, всего 3H, Рассч. 3H), 3,21 (t, J=7,4 Гц, ε -CH₂, 2H), 3,01 (t, J=7,8 Гц, ε -CH₂, 2H) и 2,74 (t, J=7,8 Гц, ε -CH₂, 2H, всего 6H, Рассч. 6H), 1,88 (m, β,γ,δ -CH₂), 1,71 (m, β,γ,δ -CH₂), 1,57 (m, β,γ,δ -CH₂) и 1,35 (m, β,γ,δ -CH₂ всего 19H, Рассч. 18H).

BHALys[Lys]₄[Boc]₈.

BHALys[Lys]₂[HCl]₄ (1,05 кг, 1,47 моль) растворяли в DMF (5,6 л) и триэтиламине (2,19 л). Добавляли тремя порциями *p*-нитрофенольный сложный эфир α,ε -(t-Boc)₂-(L)-лизина (2,35 кг, 5,03 моль) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 25°C. Добавляли раствор NaOH (0,5 М, 22 л) и полученную смесь фильтровали, промывали водой (42 л) и затем высушивали на воздухе. Твердое вещество высушивали под вакуумом при 45°C с получением BHALys[Lys]₄[Boc]₈ (2,09 кг, 1,11 моль) с выходом 76%.

^1H ЯМР (CD_3OD) δ 7,3 (m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,2 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,43 (m, α -CH), 4,34 (m, α -CH), 4,25 (m, α -CH), и 3,98 (br, α -CH, всего 7H, Рассч. 7H), 3,15 (br, ε -CH₂), 3,02 (br, ε -CH₂ всего 14H, Рассч. 14H), 1,9-1,2 (br, β,γ,δ -CH₂) и 1,44 (brs, tBu) всего за β,γ,δ -CH₂ и tBu 122H, Рассч. 144H.

BHALys[Lys]₄[TFA]₈.

К перемешиваемой суспензии BHALys[Lys]₄[Boc]₈ (4 г, 2,13 ммоль) в DCM (18 мл) добавляли TFA (13 мл) при 0°C. Твердые вещества растворяли и раствор перемешивали в течение ночи в атмосфере ар-

гона. Растворители удаляли под вакуумом, а остаточную TFA удаляли путем растирания в порошок с диэтиловым эфиром (100 мл). Продукт повторно растворяли в воде, затем подвергали сублимационной сушке с получением BHALys[Lys]₄[TFA]₈ в виде грязно-белого твердого вещества (4,27 г, 2,14 ммоль) с выходом 101%.

¹H ЯМР (D₂O) δ 7,21 (brm, 10H, Ph, Рассч. 10H), 5,91 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,17 (t, J=7,4 Гц, α-CH, 1H), 4,09 (t, J=7,1 Гц, α-CH, 1H), 4,02 (t, J=7,2 Гц, α-CH, 1H), 3,84 (t, J=6,5 Гц, α-CH, 2H), 3,73 (t, J=6,7 Гц, α-CH, 1H), 3,67 (t, J=6,7 Гц, α-CH, 1H, всего 7H, Рассч. 7H), 3,0 (m, ε-CH₂), 2,93 (m, ε-CH₂) и 2,79 (b, ε-CH₂, всего 15H, Рассч. 14H), 1,7 (br, β,γ,δ-CH₂), 1,5 (br, β,γ,δ-CH₂), 1,57 (m, β,γ,δ-CH₂) и 1,25 (br, β,γ,δ-CH₂ всего 45H, Рассч. 42H).

MS (ESI +ve) найденное значение 541,4 [M+2H]²⁺; рассч. для C₅₅H₉₉N₁₅O₇ [M+2H]²⁺ 541,2.

BHALys[Lys]₈[Boc]₁₆.

Раствор п-нитрофенольного сложного эфира α,ε-(t-Boc)₂-(L)-лизина (1,89 г, 4,05 ммоль) в DMF (25 мл) добавляли к раствору BHALys[Lys]₄[NH₂TFA]₈ (644 мг, 0,32 ммоль) и триэтиламина (0,72 мл, 5,2 ммоль) в DMF (25 мл) и реакционную смесь оставляли при перемешивании в течение ночи в атмосфере аргона. Реакционную смесь выливали на лед/воду (500 мл), затем фильтровали и собранное твердое вещество высушивали в течение ночи под вакуумом. Высушенное твердое вещество тщательно промывали ацетонитрилом с получением BHALys[Lys]₈[Boc]₁₆ в виде грязно-белого твердого вещества (0,82 г, 0,22 ммоль) с выходом 68%.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,3 (m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,2 (brs, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,48 (br, α-CH), 4,30 (br, α-CH) и 4,05 (br, α-CH, всего 16H, Рассч. 15H), 3,18 (br, ε-CH₂) и 3,02 (m, ε-CH₂ всего 31H, Рассч. 30H), 1,9-1,4 (br, β,γ,δ-CH₂) и 1,47 (br s, tBu) всего за β,γ,δ-CH₂ и tBu 240H, Рассч. 234H.

MS (ESI +ve) найденное значение 3509 [M+H-(Boc)₂]⁺, рассч. для C₁₇₃H₃₀₆N₃₁O₄₃ [M+H-(Boc)₂]⁺ 3508,5; 3408 [M+H-(Boc)₃]⁺, рассч. для C₁₆₈H₂₉₈N₃₁O₄₁ [M+H-(Boc)₃]⁺ 3408,4.

BHALys[Lys]₈[TFA]₁₆.

Раствор TFA/DCM (1:1, 19 мл) медленно добавляли к перемешиваемой суспензии BHALys[Lys]₈[Boc]₁₆ (800 мг, 0,22 ммоль) в DCM (25 мл). Твердые вещества растворяли и раствор перемешивали в течение ночи в атмосфере аргона. Растворители удаляли под вакуумом и остаточную TFA удаляли посредством повторяющегося сублимационного высушивания остатка с получением BHALys[Lys]₈[TFA]₁₆ в виде грязно-белого лиофилизата (848 мг, 0,22 ммоль) с выходом 100%.

¹H ЯМР (D₂O) δ 7,3 (br m, 10H, Ph, Рассч. 10H), 6,08 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,3 (m, α-CH), 4,18 (m, α-CH), 4,0 (m, α-CH) и 3,89 (m, α-CH, всего 16H, Рассч. 15H), 3,18 (br, ε-CH₂) и 2,94 (m, ε-CH₂ всего 32H, Рассч. 30H), 1,9 (m, β,γ,δ-CH₂), 1,68 (m, β,γ,δ-CH₂) и 1,4 (m, β,γ,δ-CH₂ всего 99H, Рассч. 90H).

MS (ESI +ve) найденное значение 2106 [M+H]⁺, рассч. для C₁₀₃H₁₉₄N₃₁O₁₅ [M+H]⁺ 2106,9.

BHALys[Lys]₁₆[Boc]₃₂.

Раствор п-нитрофенольного сложного эфира α,ε-(t-Boc)₂-(L)-лизина (1,89 г, 4,05 ммоль) в DMF (25 мл) добавляли к раствору BHALys[Lys]₈[TFA]₁₆ (644 мг, 0,32 ммоль) и триэтиламина (0,72 мл, 5,2 ммоль) в DMF (25 мл) и реакционную смесь оставляли при перемешивании в течение ночи в атмосфере аргона. Реакционную смесь выливали на лед/воду (500 мл), затем фильтровали и собранное твердое вещество высушивали в течение ночи под вакуумом. Высушенное твердое вещество тщательно промывали ацетонитрилом с получением BHALys[Lys]₁₆[Boc]₃₂ в виде грязно-белого твердого вещества (0,82 г, 0,22 ммоль) с выходом 68%.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,28 (m, 9H, Ph, Рассч. 10H), 6,2 (br s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,53 (br, α-CH), 4,32 (br, α-CH) и 4,05 (br, α-CH, всего 35H, Рассч. 31H), 3,18 (br, ε-CH₂) и 3,04 (m, ε-CH₂ всего 67H, Рассч. 62H), 1,9-1,5 (br, β,γ,δ-CH₂) и 1,47 (br s, tBu) всего за β,γ,δ-CH₂ и tBu 474H, Рассч., 474H.

MS (ESI +ve) найденное значение 6963 [M+H-(Boc)₄]⁺, рассч. для C₃₃₉H₆₁₀N₆₃O₈₇ [M+H-(Boc)₄]⁺ 6960,9; 6862 [M+H-(Boc)₅]⁺, рассч. для C₃₃₄H₆₀₄N₆₃O₈₅ [M+H-(Boc)₅]⁺ 6860,8.

BHALys[Lys]₁₆[TFA]₃₂.

Раствор TFA/DCM (1:1, 19 мл) медленно добавляли к перемешиваемой суспензии BHALys[Lys]₁₆[Boc]₃₂ (800 мг, 0,11 ммоль) в DCM (25 мл). Твердые вещества растворяли и раствор перемешивали в течение ночи в атмосфере аргона. Растворители удаляли под вакуумом и остаточную TFA удаляли посредством повторяющегося сублимационного высушивания остатка с получением BHALys[Lys]₁₆[TFA]₃₂ в виде грязно-белого лиофилизата (847 мг, 0,11 ммоль) с выходом 100%.

¹H ЯМР (D₂O) δ 7,3 (br m, 11H, Ph, Рассч. 10H), 6,06 (s, 1H, CH-Ph₂, Рассч. 1H), 4,3 (m, α-CH), 4,19 (m, α-CH), 4,0 (m, α-CH) и 3,88 (m, α-CH, всего 35H, Рассч. 31H), 3,15 (br, ε-CH₂) и 2,98 (m, ε-CH₂ всего 69H, Рассч. 62H), 1,88 (m, β,γ,δ-CH₂), 1,7 (m, β,γ,δ-CH₂) и 1,42 (m, β,γ,δ-CH₂ всего 215H, Рассч. 186H).

MS (ESI+ve) найденное значение 4158 [M+H]⁺, рассч. для C₁₉₉H₃₈₆N₆₃O₃₁ [M+H]⁺ 4157,6.

HO-Lys(α-BOC)(ε-PEG₂₁₀₀).

DIPEA (0,37 мл, 2,10 ммоль) добавляли к охлажденной льдом смеси NHS-PEG₂₁₀₀ (2,29 г, 1,05 ммоль) и N-α-t-BOC-L-лизина (0,26 г, 1,05 ммоль) в DMF (20 мл). Перемешиваемую смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение ночи, затем все оставшиеся твердые вещества от-

фильтровывали (фильтр Acrodisc с диаметром пор 0,45 мкм от PALL) перед удалением растворителя под вакуумом. Остаток поглощали ACN/H₂O (1:3, 54 мл) и очищали с помощью препаративной HPLC (Waters XBridge C18, 5 мкм, 19×150 мм, от 25 до 32% ACN (5-15 мин), от 32 до 60% ACN (15-20 мин), без буфера, 8 мл/мин, RT = 17 мин) с получением 1,41 г (56%) HO-Lys(BOC)(PEG₂₁₀₀).

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 3,96-4,09 (m, 1H), 3,34-3,87 (m, 188H), 3,32 (s, 3H), 3,15 (q, J=6,0 Гц, 2H), 2,40 (t, J=6,2 Гц, 2H), 1,28-1,88 (m, 6H), 1,41 (s, 9H).

BHAlLys[Lys]₃₂[α-BOC]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₃₂†.

К перемешиваемой смеси BHAlLys[Lys]₁₆[TFA]₃₂ (0,19 г, 24 мкмоль) в DMF (20 мл) добавляли DIPEA (0,86 мл, 4,86 ммоль). Затем данную смесь добавляли по каплям к перемешиваемой смеси PyBOP (0,62 г, 1,20 ммоль) и Lys(BOC)(PEG₂₁₀₀) (2,94 г, 1,20 ммоль) в DMF (20 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи, затем разбавляли водой (200 мл). Водную смесь подвергали фильтрации с применением Centrimate (мембрана 5 к, 20 л воды). Ультраконтрат подвергали сублимационной сушке с получением 1,27 г (73%) необходимого дендримера. HPLC (C8 XBridge, 3×100 мм, градиент: 5% ACN (0-1 мин), 5-80% ACN/H₂O (1-7 мин), 80% ACN (7-12 мин.), 80-5% ACN (12-13 мин), 5% ACN (13-15 мин), 214 нм, 0,1% TFA) Rf (мин) = 8,52.

¹H-ЯМР (300 МГц, D₂O) δ (ppm): 1,10-2,10 (m, Lys CH₂ (β, γ, δ) и BOC, 666H), 3,02-3,36 (m, Lys CH₂ (ε), 110H), 3,40 (s, PEG-OMe, 98H), 3,40-4,20 (m, PEG-OCH₂, 5750H + Lys CH поверхностный, 32H), 4,20-4,50 (m, Lys, CH внутренний 32H), 7,20-7,54 (m, BHA, 8H).

¹H ЯМР показал наличие примерно 29 PEG.

BHAlLys[Lys]₃₂[α-TFA]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₃₂†.

1,27 г (17,4 мкмоль) BHAlLys[Lys]₃₂[α-BOC]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₃₂ перемешивали в TFA/DCM (1:1, 20 мл) при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли под вакуумом, затем остаток поглощали водой (30 мл). Затем смесь концентрировали. Данный процесс повторяли еще дважды, перед тем как подвергнуть сублимационной сушке с получением 1,35 г (106%) необходимого продукта в виде вязкого бесцветного маслянистого вещества. HPLC (C8 XBridge, 3×100 мм, градиент: 5% ACN (0-1 мин), 5-80% ACN/H₂O (1-7 мин), 80% ACN (7-12 мин), 80-5% ACN (12-13 мин), 5% ACN (13-15 мин), 214 нм, 0,1% TFA) Rf (мин) = 8,51.

¹H-ЯМР (300 МГц, D₂O) δ (ppm): 1,22-2,08 (Lys CH₂ ((β, γ, δ), 378H), 3,00-3,26 (Lys CH₂ (ε), 129H), 3,40 (PEG-OMe, 96H), 3,45-4,18 (PEG-OCH₂, 5610H + Lys CH поверхностный, 32H), 4,20-4,46 (Lys, CH внутренний, 33H), 7,24-7,48 (8H, BHA). ¹H ЯМР показал наличие примерно 29 PEG.

Определение характеристик BHAlLys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†.

В табл. 6 представлены различные партии BHAlLys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†, применяемые в нижеизложенных примерах 5-9, которые характеризуются немного различной длиной PEG. Фактическое число цепей PEG на дендримере также рассчитывали с помощью протонного ЯМР.

Таблица 6

Различные партии BHAlLys[Lys] ₃₂ [α-NH ₂ TFA] ₃₂ [ε-PEG _{~2000}] ₃₂ †				
Партия	Объем	Длина PEG согласно CoA (Да)	Число PEG (x) на BHAlLys[Lys] ₃₂ [α-NH ₂ TFA] ₃₂ [ε-PEG _{~2000}] _x (согласно протонному ЯМР*)	Расчетная MW** (кДа)
1	101 мг	2200	29	75,7
2	98 мг	2200	29	75,7
3	74,8 г	2100	29	72,8
4	137 мг	2200	29	75,7
5	1,19 г	2100	31	77,0
6	18,98 г	2100	29	72,8

*Число PEG рассчитывали на основании протонного ЯМР.

В случае партии 1: число PEG = число (интеграция) протонов в области PEG ЯМР (3,4-4,2 ppm)/среднее арифметическое (среднее) число протонов на цепь PEG (PEG согласно CoA/44 Да × 4):

= 5706H / (2200/44 × 4),

= 28,53 (примерно 29 звеньев PEG),

**Молекулярную массу оценивали путем сложения MW различных компонентов.

В случае партии 1 суммарная M_w:

= M_w дендримера + M_w TFA + M_w PEG,

= BHAlLys[Lys]₃₂ + 32(TFA) + 29(PEG),

= 8258 + 3648 + 63800,

= ~75,7 кДа.

Данные протонного ЯМР для различных партий BHAlLys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂† представлены в табл. 7:

Таблица 7

Данные протонного ЯМР для различных партий

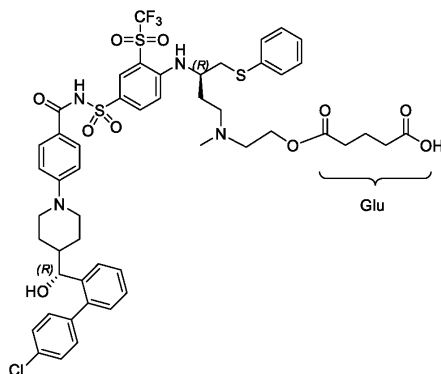
BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG_{~2000}]₃₂†

Партия	Объем	Протонный ЯМР BHALys[Lys] ₃₂ [α-NH ₂ TFA] ₃₂ [ε-PEG _{~2000}] _x
1	101 мг	1,22-2,08 (Lys CH ₂ (β,γ,δ), 378H), 3,00-3,26 (Lys CH ₂ (α), 129H), 3,40 (PEG-OMe, 96H), 3,45-4,18 (PEG-OCH ₂ , 5610H + Lys CH поверхностный, 32H), 4,20-4,46 (Lys, CH внутренний, 33H), 7,24-7,48 (8H, ВНА).
2	98 мг	Как и в случае партии 1
3	74,8 г	1,02-2,18 (Lys CH ₂ (β,γ,δ), 378H), 2,94-3,36 (Lys CH ₂ (α), 129H), 3,41 (PEG-OMe, 93H), 3,45-4,18 (PEG-OCH ₂ , 5432H + Lys CH поверхностный, 32H), 4,18-4,50 (Lys, CH внутренний, 32H), 7,12-7,64 (9H, ВНА).
4	137 мг	Как и в случае партии 1
5	1,19 г	1,02-2,16 (Lys CH ₂ (β,γ,δ), 378H), 2,93-3,36 (Lys CH ₂ (α), 129H), 3,41 (PEG-OMe, 101H), 3,45-4,18 (PEG-OCH ₂ , 5908H + Lys CH поверхностный, 32H), 4,18-4,50 (Lys, CH внутренний, 33H), 7,21-7,54 (9H, ВНА).
6	18,98 г	Как и в случае партии 3

Пример 5. Получение BHALys[Lys]₃₂[α-Glu-соединение А]₃₂†[ε-PEG₂₂₀₀]₃₂‡.

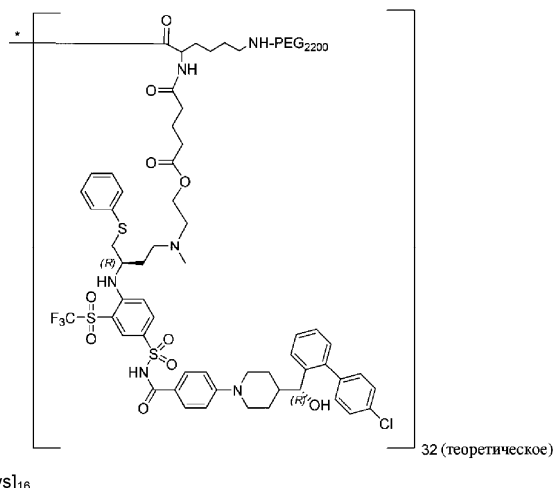
Примечание: 32† относится к теоретическому числу α-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения Glu-соединением А. Фактическое среднее число групп Glu-соединения А, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 10). 32‡ относится к теоретическому числу ε-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения PEG₂₂₀₀. Фактическое среднее число групп PEG₂₂₀₀, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 4, партия 1).

Получение Glu-соединения А



К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки суспензии соединения А (200 мг, 0,21 ммоль) в DCM (10 мл) при комнатной температуре добавляли ангидрид глutarовой кислоты (29 мг, 0,25 ммоль), DMAP (26 мг, 0,21 ммоль) и DIPEA (93 мкл, 0,53 ммоль). Суспензия быстро растворялась, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. На протяжении следующих 24 ч добавляли дополнительное количество ангидрида глutarовой кислоты до тех пор, пока по результатам HPLC реакцию не оценивали как завершенную на >80%. Затем под вакуумом удаляли летучие вещества, а остаток очищали с помощью препаративной HPLC (БЕН 300 Waters XBridge C18, 5 мкм, 30×150 мм, 60-80% ACN/вода (5-40 мин), 0,1% TFA, RT = 22 мин) с получением 117 мг (52%) продукта в виде белого твердого вещества. LCMS (C18, градиент: 50-60% ACN/H₂O (1-10 мин), 60% ACN (10-11 мин), 60-50% ACN (11-13 мин), 50% ACN (13-15 мин), 0,1% муравьиная кислота, 0,4 мл/мин, R_f (мин) = 6,30. ESI (+ve) наблюдаемый [M+H]⁺ = 1059. Расчетное значение для C₅₀H₅₄ClF₃N₄O₁₀S₃ = 1058,26 Да.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,65-1,40 (m, 4H), 1,70-2,30 (m, 6H), 2,34 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,42 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,65 (t, J=12,3 Гц, 1H), 2,79 (t, J=12,6 Гц, 1H), 2,91 (s, 3H), 3,14-3,29 (m, 2H), 3,33-3,38 (m, 3H), 3,38-3,52 (m, 3H), 3,71 (d, J=12,9 Гц, 1H), 3,89 (d, J=12,9 Гц, 1H), 4,10 (m, 1H), 4,34-4,48 (m, 3H), 6,80-6,96 (m, 3H), 7,01 (d, J=9,0 Гц, 1H), 7,09-7,24 (m, 4H), 7,26-7,46 (m, 8H), 7,61 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,68 (d, J=9,0 Гц, 2H), 8,07 (dd, J=9,3, 2,1 Гц, 1H), 8,31 (d, J=3,0 Гц, 1H).

Получение BHALys[Lys]₃₂[α-Glu-соединение A]₃₁[ε-PEG₂₂₀₀]₂₉* = BHALys[Lys]₁₆

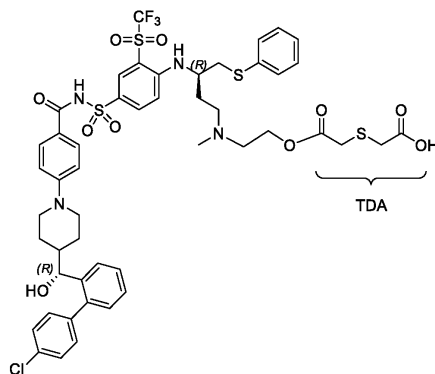
К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки смеси соединения A-Glu (67 мг, 63 мкмоль) и PyBOP (33 мг, 63,3 мкмоль) в DMF (1 мл) при комнатной температуре добавляли смесь BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₂₂₀₀]₂₉ (99 мг, 1,32 мкмоль, партия 1 из примера 4) и NMM (23 мкл, 0,21 ммоль), также в DMF (2 мл). Через 16 ч при комнатной температуре летучие вещества удаляли и остаток очищали посредством эксклюзионной хроматографии (Sephadex, LH20, MeOH). Соответствующие фракции, исходя из результатов HPLC, объединяли и концентрировали. Затем остаток поглощали водой, фильтровали (0,22 мкм) и лиофилизировали с получением 101 мг (73%) необходимого материала в виде бледно-розового твердого вещества. HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формиат аммония) R_f (мин) = 10,18.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,65-2,08 (m, 585H), 2,10-2,50 (m, 144H), 2,50-2,80 (m, 71H), 2,82-3,02 (m, 80H), 3,04-3,27 (m, 137H), 3,35 (s, 108H), 3,40-4,06 (m, 5824H), 4,08-4,62 (m, 181H), 6,54-8,40 (m, 632H).

Пример 6. Получение BHALys[Lys]₃₂[α-TDA-соединение A]_{32†}[ε-PEG_{2100, 2200}]_{32‡}.

Примечание: 32† относится к теоретическому числу α-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения TDA-соединением A. Фактическое среднее число групп TDA-соединения A, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 10). 32‡ относится к теоретическому числу ε-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения PEG_{2100, 2200}. Фактическое среднее число групп PEG_{2100, 2200}, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 4, партия 2 и партия 3).

Получение TDA-соединения A



К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки суспензии соединения A (70 мг, 74,1 мкмоль) в DCM (5 мл) при комнатной температуре добавляли ангидрид тиодигликолевой кислоты (TDA, 10 мг, 74,1 мкмоль) и DIPEA (33 мкл, 185 мкмоль). Суспензия быстро растворялась, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. На протяжении следующих 24 ч добавляли дополнительное количество ангидрида тиодигликолевой кислоты до тех пор, пока по результатам HPLC реакцию не оценивали как завершённую на >80%. Затем под вакуумом удаляли летучие вещества, а остаток очищали с помощью препаративной HPLC (BEH 300 Waters XBridge C18, 5 мкм, 30×150 мм, 60-80% ACN/вода (5-40 мин), 0,1% TFA, RT = 22 мин) с получением 63 мг (70%) продукта в виде белого твердого вещества. LCMS (C18, градиент: 50-60% ACN/H₂O (1-10 мин), 60% ACN (10-11 мин), 60-50% ACN (11-13 мин), 50% ACN (13-15 мин), 0,1% муравьиная кислота, 0,4 мл/мин, R_f (мин) = 7,33. ESI (+ve) наблюдаемый [M+H]⁺ = 1077. Расчетное значение для C₄₉H₅₂ClF₃N₄O₁₀S₄ = 1076,22 Да.

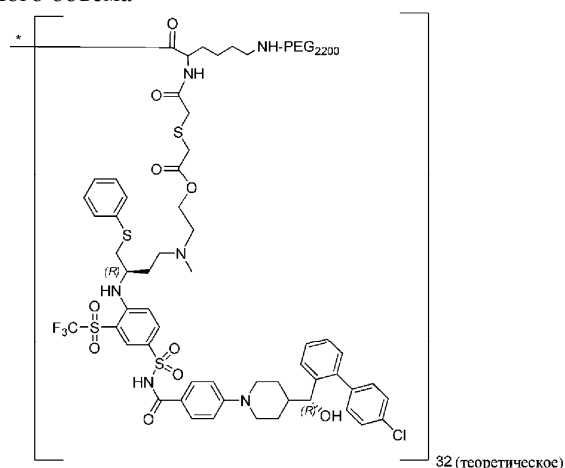
^1H -ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ (ppm): 0,87-1,04 (m, 1H), 1,08-1,36 (m, 3H), 1,71-1,90 (m, 1H), 1,96-2,40 (m, 3H), 2,64 (t, $J=12,0$ Гц, 1H), 2,77 (t, $J=12,6$ Гц, 1H), 2,94 (s, 3H), 3,18-3,30 (m, 2H), 3,35 (s, 2H), 3,40 (s, 2H), 3,46-3,55 (m, 2H), 3,73 (d, $J=13,5$ Гц, 1H), 3,90 (d, $J=12,9$ Гц, 1H), 4,02-4,15 (m, 1H), 4,40-4,48 (m, 3H), 6,86 (d, $J=9,3$ Гц, 2H), 6,92 (d, $J=9,6$ Гц, 1H), 7,02 (d, $J=9,0$ Гц, 1H), 7,08-7,46 (m, 13H), 7,61 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,67 (d, $J=9,0$ Гц, 2H), 8,08 (dd, $J=9,3, 2,1$ Гц, 1H), 8,31 (d, $J=2,1$ Гц, 1H).

Альтернативный способ получения.

Соединение А (25,50 г, $2,70 \times 10^{-2}$ моль) и TDA (4,81 г, $3,64 \times 10^{-2}$ моль, 1,35 экв.) помещали в 3-горлый реакционный сосуд, оснащенный внутренним датчиком температуры и капельной воронкой для выравнивания давления, в атмосфере N_2 . Вносили DCM (255 мл, 10 об.) и полученную суспензию охлаждали до -10°C . На протяжении 40 минутного периода вносили 0,29 М TEA в DCM (100 мл, $3,77 \times 10^2$ моль, 1,4 экв.), при этом поддерживали температуру -10°C . Технологические контроли реакции (IPC) проводили через каждый час. Реакцию считали завершённой, когда по результатам HPLC площадь пика соединения А составляла $<10\%$ (как правило, через 4,5 ч после окончания добавления). Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM (1,66 л, 65 об.) и трижды промывали водн. раствором забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) (1,02 л, 40 об.). Объединенные органические экстракты высушивали над MgSO_4 (100 г, 5% вес./об.) с получением бледно-желтого твердого вещества после концентрирования под вакуумом (0,2 бар, 25°C) в течение ночи (как правило, 24,5 г, выход 85%, 86,83% по результатам HPLC).

Получение $\text{BHALys}[\text{Lys}]_{32}[\alpha\text{-TDA-соединение А}]_{32}^{\dagger}[\varepsilon\text{-PEG}_{2100, 2200}]_{32}^{\ddagger}$.

Способ получения небольшого объема

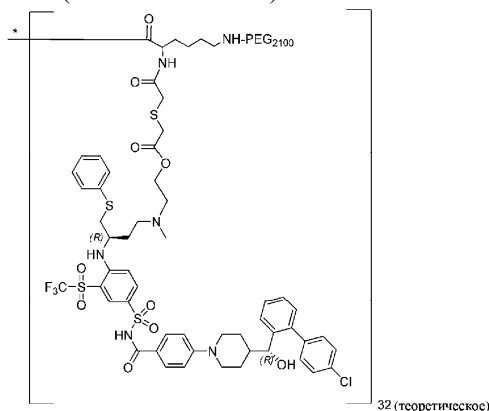


* = $\text{BHALys}[\text{Lys}]_{16}$

К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки смеси соединения А-TDA (62 мг, 58 мкмоль) и PyBOP (30 мг, 58 мкмоль) в DMF (1 мл) при комнатной температуре добавляли смесь $\text{BHALys}[\text{Lys}]_{32}[\alpha\text{-NH}_2\text{TFA}]_{32}[\varepsilon\text{-PEG}_{2200}]_{29}$ (97 мг, 1,28 мкмоль, партия 2 из примера 4) и NMM (27 мкл, 0,24 мкмоль), также в DMF (2 мл). Через 16 ч при комнатной температуре летучие вещества удаляли и остаток очищали посредством эксклюзионной хроматографии (Sephadex, LH20, MeOH). Соответствующие фракции, исходя из результатов HPLC, объединяли и концентрировали. Затем остаток поглощали водой, фильтровали (0,22 мкм) и лиофилизировали с получением 98 мг (72%) необходимого материала в виде бледно-розового твердого вещества. HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/ H_2O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формиат аммония) R_f (мин) = 10,24.

^1H -ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ (ppm): 0,62-2,33 (m, 589H), 2,37-2,69 (m, 87H), 2,69-2,92 (m, 98H), 2,94-3,27 (m, 202H), 3,35 (s, 113H), 3,37-4,10 (m, 5781H), 4,10-4,70 (m, 154H), 6,50-8,45 (m, 661H).

Альтернативный способ получения (большого объема)



* = BHALys[Lys]16

DMF (495 мл, 16,5 об.) добавляли к BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₂₉ (30,6 г, 3,82×10⁻⁴ моль, партия 3 из примера 4) и соединению A-TDA (19,01 г, 1,53×10⁻² моль, 40 экв.) в атмосфере N₂. Вносили NMM (8,06 мл, 7,33×10⁻² моль, 192 экв.) и реакционную смесь нагревали до 30°C, чтобы облегчить растворение (примерно 10 мин). Затем смесь вновь охлаждали до 20°C и двумя равными порциями вносили RuBOP (9,20 г, 1,68×10⁻² моль, 44 экв.). Мониторинг с помощью технологических контролей показал завершение реакции через 2 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью ACN (495 мл, 16,5 об.), фильтровали через шоттовскую воронку и подвергали ультрафильтрации (Merck Millipore Pellicon 3, кассета 2×0,11 м²) с 10 постоянным диализными объемами (600 мл, ACN), поддерживая трансдермальное давление (TMP) 18 PSI и 48 л/м²/час (LMH). После концентрирования при пониженном давлении (45°C, 0,2 бар; в течение 30 мин) и высушивания при температуре окружающей среды в течение дополнительных 16 ч получали 45,7 г очищенного продукта (партия A) в виде темно-желтого сиропа. Этот процесс повторяли для получения еще 46,8 г материала (партия B).

Две партии (партии A и B) по отдельности поглощали THF (4,7 об.) и нагревали до 35-40°C до тех пор, пока не происходило полное растворение (10 мин). В отдельный 3-горлый круглодонный сосуд, оснащенный внутренним термометром, капельной воронкой для выравнивания давления и магнитной мешалкой, добавляли MTBE (1,8 л, 19,5 об.). Затем растворитель охлаждали до 0°C с помощью внешней ледяной бани. Объединенные растворы партий A и B в THF переносили в капельную воронку при достижении температуры окружающей среды и вводили по каплям в перемешиваемый раствор MTBE, при этом поддерживая температуру 0°C. При первых признаках помутнения в реакционную смесь вводили затравку BHALys[Lys]₃₂[α-TDA-соединение A]₂₇[ε-PEG₂₂₀₀]₂₉ (0,95 г, 1% вес./вес. относительно введенных партий A и B) в виде твердого вещества и продолжали добавление, длящееся 30 мин. Обеспечивали созревание кристаллов в течение 60 мин, перед их переносом в вакуумный фильтр Бюхнера (диаметр 160 мм) в атмосфере N₂ (продолжительность 15 мин). Осадок на фильтре дважды промывали с помощью 5 об. MTBE (300 мл на промывку) и подсушивали (в атмосфере N₂), что длилось в целом 30 мин. Осадок на фильтре переносили в вакуумную печь, где происходило высушивание при 40°C, 0,2 бар до тех пор, пока не была достигнута постоянная масса (24 ч), с получением 74,8 г (выход 105%) сыпучего белого порошка. HPLC (C8 Phenomenix Aeris, 2,1×100 мм, градиент: 5% ACN (0-1 мин), 5-45% ACN/H₂O) (1-2 мин), 45-60% ACN (2-8 мин), 60% ACN (8-10 мин), 60-90% ACN (10-10,1 мин), 90% ACN (10,1-12 мин), 90-5% ACN (12-15 мин), 5% ACN (15-20 мин), 272 нм, 10 mM формиата аммония), R_f (мин) = 14,92.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,40-2,30 (m, 589H), 2,31-2,79 (m, 154H), 2,81-3,29 (m, 263H), 3,35 (s, 116H), 3,36-4,10 (m, 5924H), 4,13-4,62 (m, 151H), 6,28-8,52 (m, 622H).

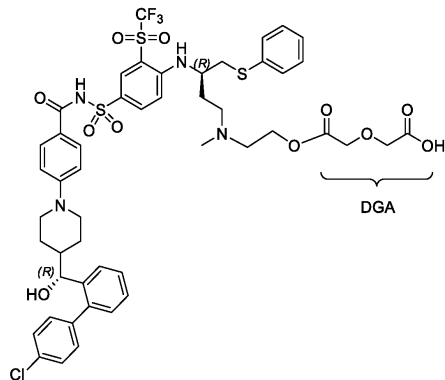
¹⁹F-ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ: -106,9 ppm (3,81 мг, FBA, интеграция выставлена на 100), -79,0 ppm (21,4 мг дендримера, 62,80).

Таким образом получали 5,36 мг соединения A (или 25,1% содержание).

Пример 7. Получение BHALys[Lys]₃₂[α-DGA-соединение A]₃₂[ε-PEG₂₂₀₀]₃₂.

Примечание: 32[†] относится к теоретическому числу α-аминогрупп, доступных для замещения DGA-соединением A. Фактическое среднее число групп DGA-соединения A, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 10). 32[‡] относится к максимальному теоретическому числу ε-аминогрупп, доступных для замещения PEG₂₂₀₀. Фактическое среднее число групп PEG₂₂₀₀, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 4, партия 4).

Получение DGA-соединения А



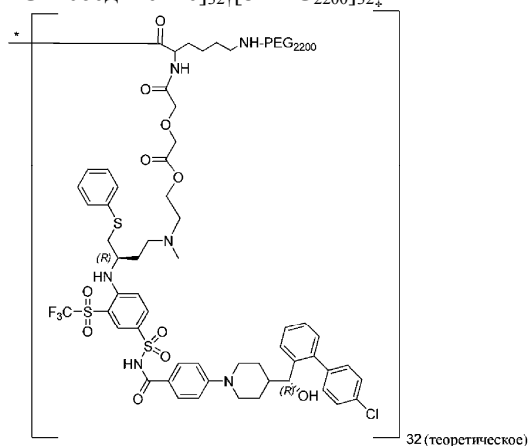
К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки суспензии соединения А (77 мг, 81,5 мкмоль) в DCM (5 мл) при комнатной температуре добавляли ангидрид дигликолевой кислоты (9,6 мг, 81,5 мкмоль) и DIPEA (36 мкл, 200 мкмоль). Суспензия быстро растворялась, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. На протяжении следующих 24 ч добавляли дополнительное количество ангидрида дигликолевой кислоты до тех пор, пока по результатам HPLC реакцию не оценивали, как завершённую на >80%. Затем под вакуумом удаляли летучие вещества, а остаток очищали с помощью препаративной HPLC (BEH 300 Waters XBridge C18, 5 мкм, 30×150 мм, 60-80% ACN/вода (5-40 мин), 0,1% TFA, RT = 22 мин) с получением 76 мг (87%) продукта в виде белого твердого вещества. LCMS (C18, градиент: 50-60% ACN/H₂O (1-10 мин), 60% ACN (10-11 мин), 60-50% ACN (11-13 мин), 50% ACN (13-15 мин), 0,1% муравьиная кислота, 0,4 мл/мин, Rf (мин) = 5,93.

ESI (+ve) наблюдаемый [M+H]⁺ = 1061.

Расчетное значение для C₄₉H₅₂ClF₃N₄O₁₁S₃ = 1060,24 Да.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,86-1,04 (m, 1H), 1,08-1,32 (m, 2H), 1,70-1,90 (m, 1H), 1,97-2,08 (m, 1H), 2,08-2,20 (m, 1H), 2,22-2,38 (m, 1H), 2,65 (t, J=12,3 Гц, 1H), 2,77 (t, J=12,6 Гц, 1H), 2,92 (s, 3H), 3,15-3,29 (m, 2H), 3,36-3,42 (m, 2H), 3,46-3,54 (m, 2H), 3,73 (d, J=12,6 Гц, 1H), 3,90 (d, J=11,7 Гц, 1H), 3,99-4,15 (m, 1H), 4,20 (s, 2H), 4,28 (s, 2H), 4,42 (j, J=8,1 Гц, 1H), 4,45-4,54 (m, 2H), 6,86 (d, J=9,3 Гц, 2H), 6,92 (d, J=9,6 Гц, 1H), 7,01 (d, J=9,3 Гц, 1H), 7,10-7,26 (m, 4H), 7,26-7,47 (m, 7H), 7,59 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,67 (d, J=9,0 Гц, 2H), 8,08 (dd, J=9,0, 2,1 Гц, 1H), 8,31 (d, J=2,1 Гц, 1H).

Получение BHAlys[Lys]₃₂[α-DGA-соединение]₃₂[ε-PEG₂₂₀₀]₃₂



* = BHAlys[Lys]₁₆

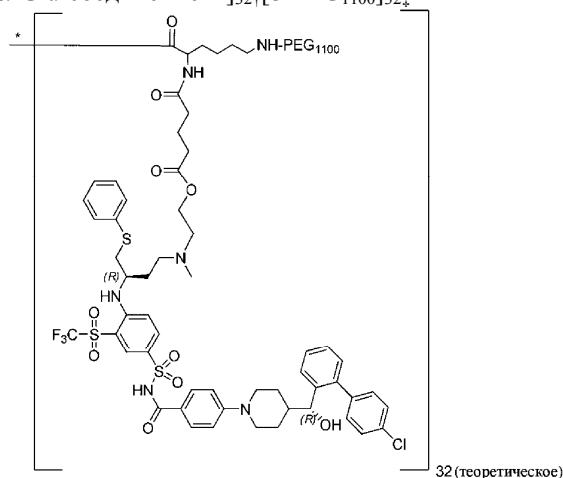
К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки смеси соединения А-DGA (76 мг, 72 мкмоль) и PyBOP (37 мг, 72 мкмоль) в DMF (1 мл) при комнатной температуре добавляли смесь BHAlys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₂₂₀₀]₂₉ (112 мг, 1,49 мкмоль, партия 4 из примера 4) и NMM (31 мкл, 0,29 ммоль), также в DMF (2 мл). Через 16 ч при комнатной температуре летучие вещества удаляли и остаток очищали посредством эксклюзионной хроматографии (Sephadex, LH20, MeOH). Соответствующие фракции, исходя из результатов HPLC, объединяли и концентрировали. Затем остаток поглощали водой, фильтровали (0,22 мкм) и лиофилизировали с получением 137 мг (88%) необходимого материала в виде бледно-розового твердого вещества. HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формиат аммония) Rf (мин) = 10,23.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,58-2,26 (m, 834H), 2,28-2,72 (m, 154H), 2,74-3,28 (m, 245H), 3,35 (s, 101H), 3,37-4,02 (m, 5824H), 4,04-4,68 (m, 272H), 6,46-8,54 (m, 652H).

Пример 8. Получение BHALys[Lys]₃₂[α-Glu-соединение А]_{32†}[ε-PEG₁₁₀₀]_{32‡}.

Примечание: 32† относится к теоретическому числу α-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения Glu-соединением А. 32‡ относится к максимальному теоретическому числу ε-аминогрупп, доступных для замещения PEG₁₁₀₀.

Получение BHALys[Lys]₃₂[α-Glu-соединение А]_{32†}[ε-PEG₁₁₀₀]_{32‡}



* = BHALys[Lys]₁₆

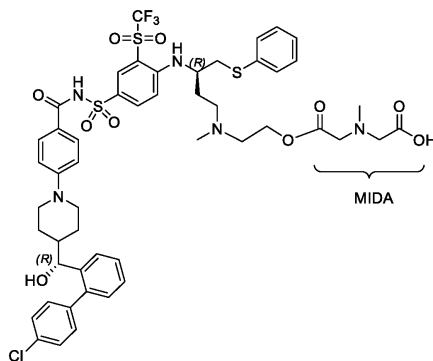
К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки смеси соединения А-Glu (57 мг, 54 мкмоль) и PyBOP (28 мг, 54 мкмоль) в DMF (1 мл) при комнатной температуре добавляли смесь BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₁₁₀₀]_{32#} (57 мг, 1,20 мкмоль) и NMM (25 мкл, 0,23 ммоль), также в DMF (2 мл). Через 16 ч при комнатной температуре летучие вещества удаляли и остаток очищали посредством эксклюзионной хроматографии (Sephadex, LH20, ACN). Соответствующие фракции, исходя из результатов HPLC, объединяли и концентрировали. Затем остаток поглощали водой, фильтровали (0,22 мкм) и лиофилизировали с получением 72 мг (78%) необходимого материала в виде бледно-розового твердого вещества. HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формиата аммония) R_f (мин) = 10,40.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,60-2,08 (m, 632H), 2,10-2,35 (m, 127H), 2,36-2,53 (m, 114H), 2,54-2,78 (m, 117H), 2,82-3,27 (m, 254H), 3,34 (s, 102H), 3,37-3,89 (m, 3226H), 3,90-4,58 (m, 185H), 6,36-8,52 (m, 654H).

Пример 9. Получение BHALys[Lys]₃₂[α-MIDA-соединение А]_{32†}[ε-PEG₂₁₀₀]_{32‡}.

Примечание: 32† относится к теоретическому числу α-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения MIDA-соединением А. Фактическое среднее число групп MIDA-соединения А, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹⁹F ЯМР (см. пример 10). 32‡ относится к теоретическому числу ε-аминогрупп на дендримере, доступных для замещения PEG₂₁₀₀. Фактическое среднее число групп PEG₂₁₀₀, присоединенных к BHALys[Lys]₃₂, определяли экспериментальным путем посредством ¹H ЯМР (см. пример 4, партия 5 и 6).

Получение MIDA-соединения А



К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки суспензии соединения А (200 мг, 0,21 ммоль) в DCM (5 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (24 мкл, 0,14 ммоль), NMM (72 мкл, 0,66 ммоль) и 4-метилморфолин-2,6-дион (33 мг, 0,26 ммоль). Суспензия быстро растворялась, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. На протяжении следующих 24 ч добавляли дополнительное количество 4-метилморфолин-2,6-диона до тех пор, пока по результатам HPLC реакцию не оценивали, как завершённую на >80%. Затем под вакуумом удаляли летучие вещества, а остаток очищали с помощью препаративной HPLC (BEH 300 Waters XBridge C18, 5 мкм, 30×150 мм,

50-70% ACN/вода (5-40 мин), 0,1% TFA, RT = 23 мин) с получением 190 мг (84%) продукта в виде белого твердого вещества. LCMS (C18, градиент: 50-60% ACN/H₂O (1-10 мин), 60% ACN (10-11 мин), 60-50% ACN (11-13 мин), 50% ACN (13-15 мин), 0,1% муравьиная кислота, 0,4 мл/мин, Rf (мин) = 2,55.

ESI (+ve) наблюдаемый [M+H]⁺ = 1074.

Расчетное значение для C₅₀H₅₅ClF₃N₅O₁₀S₃ = 1073,28 Да.

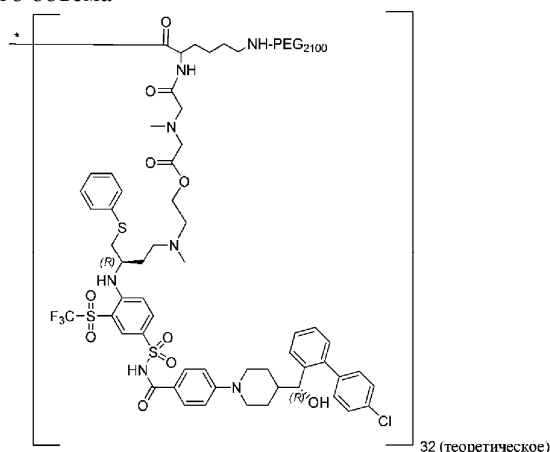
¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,86-1,07 (m, 1H), 1,08-1,37 (m, 2H), 1,72-1,88 (m, 1H), 1,96-2,09 (m, 1H), 2,10-2,24 (m, 1H), 2,24-2,38 (m, 1H), 2,66 (t, J=12,3 Гц, 1H), 2,79 (t, J=12,6 Гц, 1H), 2,92 (s, 3H), 3,00 (s, 3H), 3,14-3,28 (m, 2H), 3,33-3,43 (m, 2H), 3,47-3,57 (m, 2H), 3,72 (d, J=12,0 Гц, 1H), 3,89 (d, J=12,6 Гц, 1H), 4,03-4,15 (m, 1H), 4,06 (s, 2H), 4,19 (s, 2H), 4,43 (d, J=8,1 Гц, 1H), 4,54-4,64 (m, 2H), 6,88 (d, J=9,0 Гц, 2H), 6,93 (d, J=9,6 Гц, 1H), 7,01 (d, J=9,0 Гц, 1H), 7,09-7,25 (m, 4H), 7,26-7,47 (m, 8H), 7,61 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,68 (d, J=9,0 Гц, 2H), 8,07 (dd, J=9,3, 2,1 Гц, 1H), 8,31 (d, J=2,1 Гц, 1H).

Альтернативный способ получения.

Соединение А (28,00 г, 2,96×10⁻² моль) и 4-метилморфолин-2,6-дион (7,24 г, 5,33×10⁻² моль, 1,80 экв.) загружали в 3-горлый реакционный сосуд с внутренним датчиком температуры и капельной воронкой для выравнивания давления, в атмосфере N₂. Вносили DCM (250 мл, 9 об.) и полученную суспензию охлаждали до 0°C. На протяжении 10-минутного периода добавляли по каплям TEA (6,25 мл, 4,44×10⁻² моль, 1,5 экв.) в DCM (50 мл, 1,8 об.), при этом поддерживали температуру 0°C. Технологические контроли реакции проводили через каждый час. Реакцию считали завершенной, когда площадь пика соединения А составляла <10% (как правило, через 4,5 ч после окончания добавления). Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM (1,40 л, 50 об.) и дважды промывали с помощью 1,6 М водн. Na₂CO₃ (1,60 л, 50 об.). Органический слой высушивали над MgSO₄ (90 г, 5% вес./об.), фильтровали через шоттовскую воронку и промывали с помощью DCM (100 мл, 5 об.) с получением грязно-белого твердого вещества после концентрирования под вакуумом (0,2 бар, 30°C) (33,07 г, выход 95, 90,6% по результатам HPLC).

Получение BHALys[Lys]₃₂[α-MIDA-соединение А]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₃₂†.

Способ получения небольшого объема



* = BHALys[Lys]₁₆

К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки смеси соединения А-MIDA (730 мг, 0,68 ммоль) и PyBOP (353 мг, 0,68 ммоль) в DMF (10 мл) при комнатной температуре добавляли смесь BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₃₁ (934 мг, 12,1 мкмоль, партия 5 из примера 4) и NMM (255 мкл, 2,32 ммоль), также в DMF (10 мл). Через 16 ч при комнатной температуре летучие вещества удаляли и остаток очищали посредством эксклюзионной хроматографии (Sephadex, LH20, ACN). Соответствующие фракции, исходя из результатов HPLC, объединяли и концентрировали. Затем остаток поглощали водой, фильтровали (0,22 мкм) и лиофилизировали с получением 1,19 г (92%) необходимого материала в виде бледно-розового твердого вещества. HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формиата аммония) Rf (мин) = 10,80.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,45-1,92 (m, 565H), 2,08-2,78 (m, 228H), 2,79-3,00 (m, 96H), 3,01-3,28 (m, 180H), 3,35 (s, 180H), 3,46-4,20 (m, 6164H), 4,20-4,68 (m, 139H), 6,40-8,52 (m, 680H).

Альтернативный способ получения (большого объема).

DMF (225 мл, 16,5 об.) добавляли к BHALys[Lys]₃₂[α-NH₂TFA]₃₂[ε-PEG₂₁₀₀]₂₉ (13,49 г, 1,72×10⁻⁴ моль, партия 6 из примера 4) и соединению А-MIDA (8,50 г, 6,87×10⁻³ моль, 40,2 экв.) в атмосфере N₂. Вносили NMM (3,60 мл, 3,30×10⁻² моль, 192 экв.) и реакционную смесь нагревали до 30-35°C, чтобы облегчить растворение (примерно 5 мин). Затем смесь вновь охлаждали до 20°C и двумя равными порциями вносили PyBOP (4,13 г, 7,56×10⁻³ моль, 44 экв.). Мониторинг с помощью технологических контролей показал завершение реакции через 2 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью ACN (225 мл,

16,5 объемов), фильтровали через шоттовскую воронку и подвергали ультрафильтрации (Merck Millipore Pellicon 3, кассета 0,11 м², 10 кДа) 16 (постоянными) диализными объемами (200 мл, ACN), поддерживая трансдермальное давление (TMP) 25 PSI и 44 л/м²/ч (LMH). После концентрирования при пониженном давлении (40°C, 0,2 бар; 60 мин) и высушивания при температуре окружающей среды в течение дополнительных 16 ч получали 23,5 г очищенного материала в виде светло-оранжевого сиропа. Сироп растворяли в THF (235 мл, 10 объемов) при 35-40°C (10 мин) и фильтровали через PTFE-мембрану диаметром 47 мм с размером пор 0,45 микрона (Merck-Millipore Omnipore). Фильтрат концентрировали до половины его первоначального объема (100 мл, 4,3 об.) и помещали в капельную воронку для выравнивания давления после возвращения до температуры окружающей среды.

MTBE (400 мл, 19,5 объема) помещали в 3-горлый RBF, оснащенный внутренним датчиком температуры, и охлаждали до 0°C с помощью внешней ледяной бани в атмосфере N₂. После достижения 0°C приступали к добавлению дендримера, длящемуся 15 мин (макс, внутренняя температура 5°C), при этом перемешивание продолжали в течение 45 мин (при 0-5°C) для обеспечения возможности созревания осадка. Полученную смесь переносили на вакуумный фильтр Бюхнера (диаметром 160 мм) в атмосфере N₂ с получением первой порции влажного осадка на фильтре в течение 15 мин. Осадок на фильтре дважды промывали с помощью 5 об. MTBE (по 100 мл на промывку) и подсушивали (в атмосфере N₂), что длилось в целом 15 мин. Осадок на фильтре переносили в вакуумную печь, где происходило высушивание (при 25°C, 0,2 бар) до тех пор, пока не была достигнута постоянная масса (48 ч), с получением 18,98 г (выход 102%) сыпучего белого порошка. HPLC (C8 Phenomenix Aeris, 2,1×100 мм, градиент: 5% ACN (0-1 мин), 5-45% ACN/H₂O) (1-2 мин), 45-60% ACN (2-8 мин), 60% ACN (8-10 мин), 60-90% ACN (10-10,1 мин), 90% ACN (10,1-12 мин), 90-5% ACN (12-15 мин), 5% ACN (15-20 мин), 272 нм, 10 mM формиата аммония) Rf (мин) = 14,94.

¹H-ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ (ppm): 0,31-2,84 (m, 953H), 2,86-3,27 (m, 211H), 3,35 (s, 109H), 3,37-4,23 (m, 5734H), 4,24-4,64 (m, 95H), 6,26-8,41 (m, 632H).

¹⁹F-ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ: -107,1 ppm (3,64 мг, FBA, интеграция выставлена на 100), -79,1 ppm (31,2 мг дендримера, 108,82).

Таким образом получали 8,91 мг соединения А (или 28,6% содержание).

Пример 10. Содержание лекарственного средства, представляющего собой соединение А, в дендримерах.

Содержание лекарственного средства, представляющего собой соединение А, в дендримерах, полученных в примерах 5-9 выше, определяли посредством ЯМР.

Содержание соединения А в % по результатам ¹H ЯМР.

Содержание соединения А оценивали в виде интеграции ароматического участка (6,5-8,5 ppm), который характерен для соединения А, в сравнении с областью PEG (3,4-4,2 ppm), которая характерна для остова дендримера. В молекуле из примера 5, представленной в табл. 8, теоретическое число протонов у 32 групп соединения А в сумме с остаточным ВНА из дендримера составляет 650H. Наблюдали лишь 631H, что свидетельствует о том, что только 97% или 31 из 32 участков были заняты молекулами соединения А. Затем рассчитывали % соединения А путем умножения MW (соединения А) на 31, затем деления на суммарную MW конструкции. Т.е. содержание соединения А = (945×31)/104500 = 0,28 (или 28%).

Содержание соединения А в % по результатам ¹⁹F ЯМР.

Показатели содержания соединения А рассчитывали посредством проведения ¹⁹F ЯМР конъюгата с применением внутреннего стандарта (4-фторбензойной кислоты, FBA). Эксперимент обычно проводится путем точного отвешивания известной массы дендримера и FBA в один флакон. Затем полученное поглощают с помощью DMSO, обрабатывают ультразвуком (2 мин), после этого анализируют посредством ЯМР (100 сканирований, время задержки 30 с). Затем интегрируют пики FBA и дендримера и рассчитывают % соединения А с применением молярных соотношений (молярное соотношение соединения (3F) и FBA (1F) 3:1).

Таблица 8

Процентное содержание соединения А на Lys-дендримере

Молекула из примера	Объем	Содержание соединения А (%)	MW* (кДа)	Число молекул соединения А на дендример
5	101 мг	28,2 (¹ H ЯМР)	104,5	31

6	Небольшой объем (98 мг)	28,6 (¹ H ЯМР)	106,0	32
	Большой объем (74,8 г)	25,1 (¹⁹ F ЯМР)	96,2	27
7	137 мг	28,8 (¹ H ЯМР)	105,6	32
9	Небольшой объем (1,19 мг)	23,6 (¹⁹ F ЯМР)	99,7	25
	Большой объем (18,98 г)	28,6 (¹⁹ F ЯМР)	101,6	31

*Суммарную молекулярную массу можно оценивать с применением расчетной MW остова дендримера, MW соединения А-линкера и % содержания соединения А по результатам ЯМР.

Т.е., например: $MW = MW \text{ остова дендримера} - 32(MW \text{ TFA}) / (100 - \% \text{ содержания соединения А})$
 $((Mg \text{ соединения А-линкера} - \text{воды}) / Mg \text{ соединения А}) / 100$
 $= 75700 - 3648$
 $(100 - 28,2((1058 - 18) / 945)) / 100,$
 $= 72052$
 $(100 - 28,2(1,10)) / 100,$
 $= 72052$
 $0,6898,$
 $= \sim 104,5 \text{ кДа}.$

Пример 11. Исследование in vitro высвобождения из дендримеров (pH 7,4, в PBS 10% DMA).

Протокол:

1. Готовят PBS-буфер - PBS получают путем растворения одной таблетки PBS (Sigma, P4417) в 200 мл деионизированной воды, что обеспечивало 0,01 М фосфатный буфер, 0,0027 М хлорида калия и 0,137 М хлорида натрия при pH 7,4, 37°C.

2. Готовят смесь PBS/DMA об./об. 9:1 путем разбавления 9 мл PBS-буфера с помощью 1 мл DMA.

3. Делают растворы дендримеров с концентрацией 1 мг/мл в смеси PBS/DMA в 2 мл флаконах для HPLC.

4. Отслеживают высвобождение соединения А при комнатной температуре посредством HPLC с интервалами в 2 ч.

Способ HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 243 нм, 10 mM формиата аммония).

Таблица 9а

Процент высвобожденного соединения А
(молекулы из примеров 5-8)

Время (ч)	% высвобожденного соединения А*			
	DGA PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 7	TDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 6	Glu PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 5	Glu PEG ₁₁₀₀ Молекула из примера 8
0	0	0	0	0
0,5	10,1	5,2	0,43	0,44
2,5	62,7	24,8	2,65	1,86
4,5	80	39,5	4,38	2,96
6,5	81	50	5,96	4,35

*Определен посредством сравнения площади под пиками для соединения А (8,6 мин) с площадью под пиком для дендримера (10,8 мин) по результатам HPLC.

Таблица 9b
Процент высвобожденного
соединения А
(молекула из примера 9)

Время (ч)	% высвобожденного соединения А*#
	MIDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 9
0	1,43
2	10,59
4	17,54
6	23,71

*Определен посредством сравнения площади под пиками для соединения А (8,6 мин) с площадью под пиком для дендримера (10,8 мин) по результатам HPLC.

#Анализ молекулы из примера 9 проводили как отдельный эксперимент.

Пример 12. Исследование in vitro высвобождения из дендримеров (pH 4,5, в 0,1 М лимонной кислоте).

Протокол:

1. Готовят 0,1 М раствор лимонной кислоты (7,68 г лимонной кислоты, разбавленной до 400 мл с помощью деионизированной воды) и доводят pH до 4,5.

2. Делают растворы дендримеров с концентрацией 1 мг/мл в растворе лимонной кислоты в 2 мл флаконах для HPLC.

3. Отслеживают высвобождение соединения А при комнатной температуре посредством HPLC с различными интервалами времени.

Способ HPLC (C8 Xbridge, 3×100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 214 нм, 10 mM формата аммония).

Таблица 10a
Процент высвобожденного соединения А
(молекулы из примеров 5-8)

Время (дни)	% высвобожденного соединения А*		
	DGA PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 7	TDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 6	Glu PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 5
0	0	0	0
0,1	4,2	1,3	0,2
0,75	17,5	5,5	0,4
1,75	32,5	10,5	1,2
7	63	30	3,6

*Определен посредством сравнения площади под пиками для соединения А (8,6 мин) с площадью под пиком для макромолекулы (10,8 мин) по результатам HPLC.

Таблица 10b
Процент высвобожденного
соединения А
(молекула из примера 9)

Время (дни)	% высвобожденного соединения А*
	MIDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 9
0	1,83
2	33,87
5	65,03
7	80,7

*Определен посредством сравнения площади под пиками для соединения А (8,6 мин) с площадью под пиком для микромолекулы (10,8 мин) по результатам

HPLC.

#Анализ молекулы из примера 9 проводили как отдельный эксперимент.

Пример 13. Зависимость от pH начального высвобождения соединения А из молекул из примеров 6 и 9 в среду-носитель для доставки.

Для определения скорости гидролиза соединения А из макромолекулы при pH 2,1, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 и pH 8 применяли способ HPLC-UV.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 2,2 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 0,14 г декагидрата фосфата динатрия и 2,06 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 3 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 1,47 г декагидрата фосфата динатрия и 1,67 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 4 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 2,76 г декагидрата фосфата динатрия и 1,29 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 5 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 3,69 г декагидрата фосфата динатрия и 1,02 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 6 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 4,52 г декагидрата фосфата динатрия и 0,77 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 7 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 5,90 г декагидрата фосфата динатрия и 0,37 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 8 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 6,97 г декагидрата фосфата динатрия и 0,06 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Во флакон точно отвешивали 1-2 мг дендримера и добавляли 1 мл буфера. Образец перемешивали с помощью магнитной мешалки при 37°C в течение вплоть до 130 ч. Периодически образец анализировали посредством HPLC-UV. Концентрацию свободного соединения А определяли путем сравнения отклика HPLC-UV у соединения А в образце с откликом HPLC-UV у стандарта с известной концентрацией.

Таблица 11

Способ HPLC для молекула из примера 13

Стандартное получение:	5 мг соединения А в 10 мл смеси MeCN:вода 1:1		
Колонка:	Waters XBridge C8, 50 x 4,6 мм, 2,7 мкм		
Температура колонки:	40°C		
Объем вводимой пробы (мкл):	5 мкл (программа инжектора с брекетином образца с помощью 5 мкл диметилацетамида)		
Длина волны детекции:			
Расход (мл/мин)			
Подвижная фаза А (MPA):	0,3% TFA в воде		
Подвижная фаза В (MPB):	0,3% TFA в ацетонитриле		
Программа:	Время (мин)	% MPA	% MPB
	0		

Константу скорости при каждом pH рассчитывали, исходя из наблюдаемых концентраций раствора с течением времени, с применением способа подбора кривой методом наименьших квадратов. Наблюдаемые константы скорости обобщенно представлены на фиг. 8. Данные показали, что молекула из примера 9 демонстрировала меньшую изменчивость начального высвобождения по всему протестированному диапазону pH, чем молекула из примера 6.

Пример 14. In vitro высвобождение соединения А из дендримеров в плазме крови крысы и мыши.

Протокол: к 0,5 мл плазмы крови (подвергнутой центрифугированию и фильтрации) мыши (или крысы) добавляли 0,1 мл раствора дендримера (в эквиваленте примерно 2 мг/мл соединения А в физиологическом растворе). Смеси перемешивали вихревым способом (30 с), затем инкубировали при 37°C. В различные моменты времени отбирали аликвоты (0,1 мл) и добавляли к ACN (0,2 мл, 5% муравьиная кислота). Полученные смеси перемешивали вихревым способом (30 с), центрифугировали (10 мин, 4°C), фильтровали и анализировали HPLC ((C8 Xbridge, 3x100 мм, градиент: 42-50% ACN/H₂O) (1-7 мин), 50-80% ACN (7-8 мин), 80% ACN (8-11 мин), 80-42% ACN (11-12 мин), 42% ACN (12-15 мин), 243 нм, 10 mM формиата аммония, RT (соединение А) = 6,7 мин). В случае эксперимента, проводимого с плазмой крови мыши, количество соединения А определяли количественно относительно стандарта соединения А и % высвобожденного соединения рассчитывали путем сравнения высвобожденного мате-

риала и материала, содержащегося в конъюгате. В случае эксперимента, проводимого с плазмой крови крысы, высвобождение из DGA PEG2200 (молекула из примера 7) через 22,5 ч использовали как стандарт и принимали за 100%. Результаты обобщены в табл. 12a и 12b.

Таблица 12a

Результаты in vitro высвобождения соединения А
в плазме крови крысы

% соединения А, высвобожденного в плазму крови крысы при 37С*					
Время (ч)	DGA PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 7	TDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 6	MIDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 9	Glu PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 5	Glu PEG ₁₁₀₀ Молекула из примера 8
0	0	0	0	0	0
0,5	32	6	3	0,3	0,2
2,5	93	31	9	3,5	2,6
4,5	96	49	14	4,8	4,5
22,5	100	89,5	57	25,3	21

*Все данные нормализовали относительно DGA PEG₂₂₀₀ (молекула из примера 7) и считалось, что в данном образце происходило полное высвобождение.

Таблица 12b

Результаты in vitro высвобождения соединения А
в плазме крови мыши

% соединения А, высвобожденного в плазму крови мыши при 37С*					
Время (ч)	DGA PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 7	TDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 6	MIDA PEG ₂₁₀₀ Молекула из примера 9	Glu PEG ₂₂₀₀ Молекула из примера 5	Glu PEG ₁₁₀₀ Молекула из примера 8
0	0	0	0	0	0
0,5	32,6	9,1	2,1	0,9	1,4
2,5	70,8	33,2	6,7	2,9	2,8
4,5	76,1	50,6	11,3	5,8	4,3
22,5	87,5	88,4	46,5	22,9	22,1

*Измеренный относительно стандартного раствора соединения А.

Пример 15. Растворимость дендримера при pH 7,4 и 4,5.

Протокол:

1. Точно отвешивали 10 мг дендримера во флакон.
2. Во флакон осторожно добавляли аликвоты буфера, чтобы обеспечить растворение. Примечание: смесь осторожно перемешивали вращательными движениями в течение нескольких минут между добавлением аликвот. Чтобы облегчить растворение, также применяли обработку ультразвуком.

Таблица 13

Результаты исследований растворимости при pH 7,4 и 4,5

Линкер	Молекулярная масса (кДа)	Весовой % соединения А (по результатам ЯМР)	Растворимость при pH 7,4 в PBS; концентрация дендримера, мг/мл (соединение А, мг/мл)	Растворимость при pH 4,5 в 0,1 М лимонной кислоте; концентрация дендримера, мг/мл (соединение А, мг/мл)
Молекула из примера 5	104,5	28,2	158 (44,5)	162 (45,7)
Молекула из примера 6	106,0	28,6	153 (43,6)	141 (40,2)
Молекула из примера 7	105,6	28,8	142 (41,0)	157 (45,2)
Молекула из примера 8	76,7	39,4	125 (49,3)	121,3 (48,0)

Пример 16. Растворимость дендримера при pH 4 и 5.

Для определения растворимости дендримеров в водных буферах применяли визуальный метод. Данные представляют отдельные эксперименты.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 5 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 3,69 г додекагидрата фосфата динатрия и 1,02 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

Готовили буфер Мак-Илвейна с pH 4 путем добавления 50 мл деионизированной воды к 2,76 г до-

декагидрата фосфата динатрия и 1,29 г моногидрата лимонной кислоты. Раствор доводили до общего объема 100 мл с помощью деионизированной воды и pH подтверждали.

В стеклянный флакон добавляли 1 мл буфера и магнитную мешалку. Дендример добавляли во флакон аликвотами при перемешивании. Оба дендримера из примеров 6 и 9 полностью растворялись при добавлении приблизительно 250 мг, после чего раствор становился слишком вязким для надлежащего перемешивания. Растворимость приведена в граммах растворенного вещества на 1 г раствора, и считается, что плотность буфера составляет 1 г/мл.

Таблица 14

Результаты исследований растворимости при pH 4 и 5

Молекула из примера	Буфер	Визуальное наблюдение растворимости	Эквивалент соединения А
Молекула из примера 6	Буфер Мак-Илвейна, pH 4	>0,189 г/г	>0,048 г/г
Молекула из примера 9	Буфер Мак-Илвейна, pH 5	>0,224 г/г	>0,064 г/г

Пример 17. Составы на основе дендримеров.

1. Составы для телеметрических исследований на крысах.

Выбирали флаконы, содержащие соответствующее количество лиофилизированного дендримера. Затем в каждый флакон добавляли по примерно 0,5-1 мл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) и содержимое флаконов перемешивали вихревым способом до тех пор, пока дендример не переходил в раствор. Содержимое каждого флакона объединяли и переносили в отдельный флакон, ополаскивая оставшимся PBS, чтобы довести до нужного объема. Составы готовили при комнатной температуре, за исключением состава на основе молекулы из примера 8. Составы, содержащие молекулу из примера 8, осторожно нагревали на водяной бане, установленной на 40°C, чтобы облегчить диспергирование молекулы из примера 8 в среде-носителе. Все составы немедленно вводили в виде дозы по меньшей мере в течение 30 мин после получения. Обобщенные данные касательно составов на основе PBS, приведены в табл. 15а.

Таблица 15а

Составы на основе PBS, содержащие молекулы из примеров 5, 6 и 8, для телеметрических исследований на крысах

Ингредиенты	Молекула из примера 5 (эквивалент 2 мг/мл соединения А)	Молекула из примера 5 (эквивалент 6 мг/мл соединения А)	Молекула из примера 6 (эквивалент 2 мг/мл соединения А)	Молекула из примера 6 (эквивалент 4 мг/мл соединения А)
Забуференный фосфатом физиологический раствор	~9,5 мл	~9,5 мл	~9,5 мл	~9,5 мл
Дендример	67 мг	201 мг	67 мг	134 мг
Забуференный фосфатом физиологический раствор	~9,2 мл	~9,5 мл	~10,3 мл	
Дендример	194 мг	67 мг	218 мг	

Готовили цитрат-фосфатный (Мак-Илвейна) буфер, pH 4. Для приготовления 100 мл буфера в цилиндр отвешивали 1,29 г моногидрата лимонной кислоты и 2,76 г додекагидрата двухосновного фосфата натрия и добавляли 95 мл воды для инъекций. Среду-носитель перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. Затем pH измеряли и, при необходимости, доводили до pH 4 с помощью 0,1 М HCl или NaOH. Среду-носитель доводили до нужного объема водой для инъекций.

Выбирали флаконы, содержащие соответствующее количество лиофилизированного дендримера. Затем в каждый флакон добавляли по 0,5-1 мл цитрат-фосфатного (Мак-Илвейна) буфера, pH 4, и, при необходимости, содержимое флаконов перемешивали вихревым способом до тех пор, пока макромолекула не переходила в раствор. Содержимое каждого флакона объединяли и переносили в отдельный флакон, ополаскивая оставшимся PBS, чтобы довести до нужного объема. Их немедленно вводили в виде дозы, по меньшей мере в течение 30 мин после получения. Далее приведены обобщенные данные.

Таблица 15b

Составы на основе молекулы из примера 9 для телеметрических исследований на крысах

Ингредиенты	Молекула из примера 9 (эквивалент 2 мг/мл соединения А)	22,6 мг/мл молекула из примера 9 (эквивалент 6 мг/мл соединения А)
Цитрат/фосфатный буфер Мак-Илвейна, pH 4	~8 мл	~8 мл
Дендример	60 мг	181 мг

2. Составы для исследований осаждения (растворимости).

Получение цитрат-фосфатного буфера.

Для получения цитрат/фосфатного буфера применяли следующий способ. Соответствующее количество лимонной кислоты и додекагидрата двухосновного фосфата натрия отвешивали в мерную колбу объемом 100 мл и добавляли 95 мл воды для инъекций с последующим перемешиванием (или обработкой ультразвуком). pH полученного раствора регулировали до целевого pH (т.е. 4 или 5) и буфер доводили до нужного объема водой для инъекций (т. е. 100 мл).

Таблица 15с

Композиция цитрат-фосфатного буфера (Мак-Илвейна) на 100 мл буфера для исследования осаждения (растворимости)

Молекула из примера	pH буфера	Моногидрат лимонной кислоты/граммы	Додекагидрат двухосновного фосфата натрия/граммы
Молекула из примера 6	4	1,29	2,76
Молекула из примера 9	5	1,02	3,69

Получение среды-носителя.

Цитрат-фосфатные (Мак-Илвейна) буферы, указанные в табл. 15с, применяли для получения разбавленных забуференных сред-носителей путем осуществления разбавления 1:10 с помощью 5% вес./об. глюкозы, в присутствии или отсутствии 1% вес./об. Kolliphor HS-15 (полиэтиленгликоль (15)-гидроксистеарат).

Коммерчески доступный 5% вес./об. раствор глюкозы добавляли примерно до 90% от целевого объема. В случае разбавленных буфером сред-носителей, содержащих Kolliphor, добавляли эквивалентное 1% вес./об. количество Kolliphor HS-15 и среду-носитель перемешивали для растворения Kolliphor HS-15. Вслед за этим pH регулировали до целевого pH с помощью 0,1 М HCl или NaOH (при необходимости). Затем среды-носители доводили до нужного объема с помощью 5% вес./об. глюкозы и фильтровали с применением шприцевого PVDF-фильтра с размером пор 0,22 мкм.

Получение состава.

Составы, содержащие молекулы из примера 6 и примера 9 (в присутствии или отсутствии Kolliphor HS-15), получали в объеме 5 мл в разбавленной забуференной среде-носителе в двух повторностях (n=2) при концентрациях, указанных в табл. 15d.

Таблица 15d

Составы, содержащие молекулы из примеров 6 и 9 с Kolliphor и без него

Молекула из примера	Концентрация соединения А (мг/мл)	Концентрация дендримера (мг/мл)	pH состава
Молекула из примера 6	0,74	3	4
Молекула из примера 6	24,8	100	4
Молекула из примера 9	0,9	3	5
Молекула из примера 9	28,6	100	5

Для получения составов в подходящий контейнер с магнитной мешалкой отвешивали соответствующее количество дендримера. Во время функционирования магнитной мешалки добавляли разбавленную забуференную среду-носитель (цитрат/фосфатный буфер, pH 4 или 5, разбавленный 1:10 с помощью 5% вес./об. раствора глюкозы, содержащего 1% вес./об. Kolliphor HS-15) с получением 95% от целевого объема. Чтобы облегчить растворение, состав непрерывно перемешивали, избегая чрезмерного пенообразования, до тех пор, пока не образовывался прозрачный раствор, и pH регулировали. Вслед за этим состав доводили до нужного объема (5 мл) с помощью разбавленной забуференной среды-носителя и регистрировали конечный pH.

Определение кинетических параметров осаждения.

Состав хранили при комнатной температуре и обеспечивали защиту от света, и при этом проводили визуальную оценку образцов с применением устройства Seidenader и негатоскопа в моменты времени: 0, 3, 6, 24, 48, 72 и 96 ч, чтобы исключить присутствие видимых взвешенных частиц. В табл. 15е представлены обобщенные данные касательно результатов визуальной оценки.

Таблица 15е

Обобщенные данные касательно результатов осаждения

Молекула из примера	Концентрация дендримера (мг/мл)	Комментарии
Молекула из примера 6 (+Kolliphor HS15)	3	Вплоть до семи дней ppt не наблюдали
	100	Вплоть до семи дней ppt не наблюдали
Молекула из примера 6 (- Kolliphor HS15)	3	Вплоть до семи дней ppt не наблюдали
	100	Вплоть до семи дней ppt не наблюдали
Молекула из примера 9 (+Kolliphor HS15)	3	Вплоть до 96 часов ppt не наблюдали
	100	Появление ppt через 42 часа
Молекула из примера 9 (- Kolliphor HS15)	3	Вплоть до 96 часов ppt не наблюдали
	100	Появление ppt через 42 часа

С учетом очень низкой растворимости соединения А в воде наблюдаемое осаждение ожидалось в гораздо более короткий срок.

3. Составы для токсикологических исследований.

Составы для токсикологических исследований на основе молекулы из примера 6. Молекулу из примера 6 составляли в цитрат-фосфатном буфере с pH 4, разбавленном 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащем 1% вес./об. Kolliphor HS-15 (полиэтиленгликоль (15)-гидроксистеарат), при концентрациях молекулы из примера 6 вплоть до 121 мг/мл (концентрация соединения А вплоть до 30 мг/мл).

Получение цитрат-фосфатного буфера.

Соответствующее количество цитрат-фосфатного буфера (Мак-Илвейна) с pH 4 получали, как указано в табл. 14 выше.

Получение среды-носителя. Цитрат-фосфатный буфер с pH 4 (согласно табл. 15с) применяли для получения разбавленной забуференной среды-носителя путем осуществления разбавления 1:10 с помощью 5% вес./об. глюкозы, в присутствии 1% вес./об. Kolliphor HS-15, как указано в предыдущем разделе.

Получение состава.

Цитрат/фосфатный буфер с pH 4, разбавленный 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15, применяли для получения составов на основе молекулы из примера 6, как указано в предыдущем разделе.

Составы на основе молекулы из примера 6 получали при комнатной температуре и вводили в виде дозы в течение 60 мин после получения. Получали составы, содержащие от 4 до 25 мг/мл молекулы из примера 6 (эквивалент 1 и 6,2 мг/мл соединения А). Объемы охватывали диапазон от 15 до 47 мл. Чтобы исключить присутствие частиц, проводили визуальную оценку состава.

Составы для токсикологических исследований, содержащие макромолекулу из примера 9.

Молекулу из примера 9 составляли в цитрат-фосфатном буфере с pH 5, разбавленном 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащем 1% вес./об. Kolliphor HS-15 (полиэтиленгликоль (15)-гидроксистеарат), при концентрациях молекулы из примера 9 от 3,1 до 105 мг/мл (эквивалент концентрации соединения А 0,9 и 30 мг/мл).

Получение цитрат-фосфатного буфера. 100 мл цитрат-фосфатного буфера (Мак-Илвейна) с pH 5 получали, как указано в предыдущем разделе.

Получение среды-носителя.

Цитрат-фосфатный буфер (Мак-Илвейна) с pH 5 (согласно примеру 16b) применяли для получения разбавленной забуференной среды-носителя путем осуществления разбавления 1:10 с помощью 5% вес./об. глюкозы в присутствии 1% вес./об. Kolliphor HS-15, как указано в предыдущем разделе.

Получение состава.

Цитрат-фосфатный буфер с pH 5, разбавленный 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15, применяли для получения составов на основе молекулы из примера 9, как указано в предыдущем разделе. Чтобы исключить присутствие частиц, проводили визуальную оценку состава.

Составы на основе молекулы из примера 9 получали при комнатной температуре и вводили в виде дозы в течение 75 мин после получения. Получали составы, содержащие от 12,5 до 100 мг/мл молекулы из примера 9 (эквивалент концентрации соединения А 3,6 и 28,6 мг/мл). Объемы охватывали диапазон от 6 до 18 мл.

Пример 18. Исследования эффективности на крысах и мышах.

Составы, применяемые в исследованиях эффективности, получали следующим образом.

Получение составов на основе PBS и макромолекул из примеров 6 и 9 для введения дозы при исследовании эффективности в отношении RS4;11.

В мерную колбу отвешивали соответствующее количество молекул из примеров 6 или 9. Добавляли 10 мл забуференного фосфатом физиологического раствора в модификации (PBS) Дульбекко и затем составы перемешивали до тех пор, пока соединение полностью не растворялось. См. также получение составов для телеметрических исследований на крысах в примере 17а.

Составы на основе молекулы из примера 6 для введения дозы в исследовании эффективности в отношении SuDHL-4.

Макромолекулу из примера 6 можно составлять в цитрат/фосфатном буфере с pH 4, разбавленном 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащем 1% вес./об. Kolliphor HS-15, при концентрациях молекулы из примера 6 вплоть до 121 мг/мл (эквивалент концентрации соединения А вплоть до 30 мг/мл).

Получали 100 мл цитрат/фосфатного буфера Мак-Илвейна с pH 4. Во флакон отвешивали 1,29 г моногидрата лимонной кислоты и 2,76 г додекагидрата двухосновного фосфата натрия и добавляли 95 мл воды для инъекций. Среду-носитель перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. Затем pH измеряли и, при необходимости, доводили до pH 4 с помощью 0,1 М HCl или NaOH. Среду-носитель доводили до нужного объема (100 мл) водой для инъекций.

Данный буфер Мак-Илвейна применяли для получения разбавленной буфером среды-носителя (цитрат/фосфатный буфер с pH 4, разбавленный 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15). Необходимое количество цитрат/фосфатного буфера Мак-Илвейна, эквивалентное 10% от общего целевого объема, который требуется получить, добавляли в подходящий контейнер. Коммерчески доступный 5% раствор глюкозы добавляли примерно до 90% от целевого объема. Добавляли Kolliphor HS-15, эквивалентный 1% вес./объем, и среду-носитель перемешивали для растворения Kolliphor HS-15. pH измеряли и доводили до pH $4,0 \pm 0,05$ с помощью 0,1 М HCl или NaOH (при необходимости). Затем среду-носитель доводили до нужного объема с помощью 5% глюкозы. При необходимости ее стерилизовали фильтрованием с применением шприцевого фильтра с размером пор 0,22 мкм.

Чтобы получить состав на основе молекулы из примера 6 с более высокой дозой (10 мг/мл соединения А или эквивалента молекулы из примера 6, составляющего 39 мг/мл), 390 мг молекулы из примера 6, эквивалента 100 мг соединения А, переносили в подходящий контейнер с магнитной мешалкой. Во время функционирования магнитной мешалки добавляли разбавленную буфером среду-носитель (цитрат/фосфатный буфер с pH 4, который был разбавлен 1:10 с помощью 5% глюкозы, содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15) для получения 95% от целевого объема (9,5 мл). Перемешивание состава продолжали, чтобы облегчить растворение, избегая чрезмерного вспенивания, до тех пор, пока не образовывался прозрачный раствор. Затем состав доводили до нужного объема (0,5 мл) с помощью разбавленной буфером среды-носителя и проверяли pH. Проводили визуальную оценку состава, чтобы исключить присутствие частиц. Из раствора более высокой концентрации получали растворы с концентрацией 2 и 6 мг/мл.

Составы на основе молекулы из примера 6 получали при комнатной температуре и вводили в виде дозы в течение 5 мин после получения. Способы их получения были такими же, как описано ранее в примере 17 (составы для токсикологических исследований).

Составы на основе макромолекулы из примера 9 для исследования эффективности в отношении SuDHL-4. Молекулу из примера 9 составляли в цитрат/фосфатном буфере с pH 5, разбавленном 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащем 1% вес./об. Kolliphor HS-15, при концентрациях молекулы из примера 9 не более 105 мг/мл (эквивалент концентрации соединения А вплоть до 30 мг/мл).

Получали 100 мл цитрат/фосфатного буфера Мак-Илвейна с pH 5. Во флакон отвешивали 1,02 г моногидрата лимонной кислоты и 3,69 г додекагидрата двухосновного фосфата натрия и добавляли 95 мл воды для инъекций. Среду-носитель перемешивали (или обрабатывали ультразвуком) для растворения. Затем pH измеряли и, при необходимости, доводили до pH 5 с помощью 0,1 М HCl или NaOH. Среду-носитель доводили до нужного объема (100 мл) водой для инъекций.

Данный буфер Мак-Илвейна применяли для получения разбавленной буфером среды-носителя (цитрат/фосфатный буфер с pH 5, разбавленный 1:10 с помощью 5% глюкозы и содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15). Необходимое количество цитрат/фосфатного буфера Мак-Илвейна, эквивалентное 10% от общего целевого объема, который требуется получить, добавляли в подходящий контейнер. Коммерчески доступный 5% раствор глюкозы добавляли примерно до 90% от целевого объема. Добавляли Kolliphor HS-15, эквивалентный 1% вес./объем, и среду-носитель перемешивали для растворения Kolliphor HS-15. pH измеряли и доводили до pH $5,0 \pm 0,05$ с помощью 0,1 М HCl или NaOH (при необходимости). Затем среду-носитель доводили до нужного объема с помощью 5% глюкозы. При необходимости ее стерилизовали фильтрованием с применением шприцевого фильтра с размером пор 0,22 мкм.

Чтобы получить состав на основе молекулы из примера 9 с более высокой дозой (10 мг/мл соединения А или эквивалента молекулы из примера 9, составляющего 37 мг/мл), 370 мг молекулы из примера 9, эквивалента 100 мг соединения А, переносили в подходящий контейнер с магнитной мешалкой. Во время функционирования магнитной мешалки добавляли разбавленную буфером среду-носитель (цитрат/фосфатный буфер с pH 4, который был разбавлен 1:10 с помощью 5% глюкозы, содержащий 1% вес./об. Kolliphor HS-15) для получения 95% от целевого объема (9,5 мл). Продолжали перемешива-

ние, чтобы облегчить растворение, избегая чрезмерного вспенивания, до тех пор, пока не образовывался прозрачный раствор. Затем состав доводили до нужного объема (0,5 мл) с помощью разбавленной буфером среды-носителя и проверяли pH. Проводили визуальную оценку состава, чтобы исключить присутствие частиц. Из раствора более высокой концентрации получали растворы с концентрацией 2 и 6 мг/мл.

Составы на основе молекулы из примера 9 получали при комнатной температуре и вводили в виде дозы в течение 5 мин после получения.

Эффективность молекул из примеров 6 и 9 в отношении модели с ксенотрансплантатом RS4;11 5×10^6 клеток RS4;11 в общем объеме 100 мкл инокулировали подкожно в правый бок мыши. Когда объем опухоли достигал примерно $\sim 350 \text{ мм}^3$, мышей, несущих опухоль, рандомизировали в группы из 4 животных и обрабатывали либо контрольной средой-носителем (PBS), либо средством обработки. На фиг. 9 показано, что дендримеры проявляют отличающуюся эффективность при различных скоростях высвобождения. Молекула из примера 6 в эквиваленте 30 мг/кг соединения А и молекула из примера 9 в эквиваленте 10 мг/кг соединения А при однократной i.v. дозе показали аналогичную или немного большую активность, чем 10 мг/кг соединения А HP- β -CD при однократном i.v. введении (100%, регрессия 98% относительно 90% соответственно).

Таблица 16

Обобщенные данные касательно ингибирования и регрессии для молекул из примеров 6 и 9

Номер группы	Обработка	Эффективность			
		% ингибирования День (47)	% регрессии День (47)	P-значение День (47)	T-C (дни)
1	Среда-носитель				
2	Соединение А, 5 мг/кг	>100	90	<0,0001	
3	Молекула из примера 6 в эквиваленте 10 мг/кг соединения А (39 мг/кг макромолекулы)	>100	56	<0,0001	
4	Молекула из примера 6 в эквиваленте 30 мг/кг соединения А (117 мг/кг макромолекулы)	>100	100	<0,0001	>32
	Молекула из примера 9 в эквиваленте 10 мг/кг соединения А (37 мг/кг макромолекулы)	>100	98	0,0085	

Когда объем опухоли RS4;11 достигал примерно $\sim 400\text{-}600 \text{ мм}^3$, группы из трех мышей, несущих опухоль, обрабатывали однократной дозой либо среды-носителя (PBS), либо молекулы из примера 6 IV из расчета 10 и 30 мг/кг. Опухоли собирали в различные моменты времени после введения дозы и обрабатывали для проведения анализа. Результаты показали, что линкер индуцирует сопоставимый апоптотический ответ, на что указывает расщепленная каспаза 3, причем ответы достигали максимума через 16-28 ч после введения дозы (фиг. 10). Молекула из примера 6 в эквиваленте 30 мг/кг соединения А (117 мг/кг молекулы из примера 6) индуцировала наиболее высокий ответ в виде CC3.

На фиг. 11 показано, что молекула из примера 9 и молекула из примера 6, вводимые дозой в эквиваленте 20 мг/кг соединения А (74 и 78 мг/кг дендримера, соответственно), были немного эффективнее соединения А в составе на основе HP- β -CD (см. пример 2) из расчета 10 мг/кг еженедельно.

Кроме того, клеточную гибель (апоптоз) измеряли с применением расщепленной PARP (фиг. 12). Соединение А в составе на основе HP- β -CD (см. пример 2) индуцировало расщепление PARP непосредственно после обработки, через 1 и 3 ч, тогда как молекула из примера 9 вызывала максимальную клеточную гибель через 20 ч после введения однократной дозы.

Эффективность молекул из примеров 5, 7 и 8 в отношении модели с ксенотрансплантатом RS4;11 у мышей.

Молекулы из примеров 5, 7 и 8 составляли в PBS и вводили дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А мышинной модели с ксенотрансплантатом RS4;11. На фиг. 13 продемонстрировано, что молекула из примера 7, вводимая дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А, индуцирует регрессию опухоли, тогда как молекулы из примеров 5 и 8, вводимые дозой в эквиваленте 10 мг/кг соединения А, не проявляли значимой противоопухолевой активности.

Эффективность молекулы из примера 6 в отношении моделей с ксенотрансплантатом RS4;11 у крыс Rag2-/-.

На фиг. 14 показано, что молекула из примера 6, вводимая дозой в эквиваленте 30 мг/кг соединения А (117 мг/кг макромолекулы), вызывает регрессию опухоли RS4;11. Однократная доза молекулы из примера 6 в эквиваленте 10 мг/кг соединения А (39 мг/кг молекулы из примера 6) ингибировала рост опухоли (остановка роста).

Молекулы из примеров 6 и 9 усиливают ингибирование роста опухоли ритуксимабом в модели с ксенотрансплантатом SuDHL-4 у мышей SCID. Для тестирования способности молекул из примеров 6 и 9 усиливать активность ритуксимаба в ингибировании роста опухоли применяли модель с ксенотрансплантатом SuDHL-4. Когда опухоли вырастали примерно до 175-250 мм³, мышей рандомизировали в следующие группы:

- (1) группа контроля со средой-носителем;
- (2) группа обработки молекулой из примера 6 (в эквиваленте 50 мг/кг соединения А, 195 мг/кг молекулы из примера 6, i.v. один раз в неделю в течение 5 недель);
- (3) группа обработки молекулой из примера 9 (в эквиваленте 50 мг/кг соединения А, 185 мг/кг молекулы из примера 9, i.v. один раз в неделю в течение 5 недель);
- (4) группа ритуксимаба (10 мг/кг i.p. раз в неделю в течение 5 недель);
- (5) молекула из примера 6 (эквивалент 10 мг/кг соединения А, 39 мг/кг молекулы из примера 6) плюс ритуксимаб;
- (6) молекула из примера 6 (эквивалент 30 мг/кг соединения А, 117 мг/кг молекулы из примера 6) плюс ритуксимаб;
- (7) молекула из примера 6 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 195 мг/кг молекулы из примера 6) плюс ритуксимаб.
- (8) молекула из примера 9 (эквивалент 10 мг/кг соединения А, 37 мг/кг молекулы из примера 9) плюс ритуксимаб;
- (9) молекула из примера 9 (эквивалент 30 мг/кг соединения А, 111 мг/кг молекулы из примера 9) плюс ритуксимаб;
- (10) молекула из примера 9 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 185 мг/кг молекулы из примера 9) плюс ритуксимаб;

Размеры опухоли измеряли 2 раза в неделю и рассчитывали следующим образом: объем опухоли = $(A \times B^2)/2$, где А и В - длина и ширина опухоли (в мм) соответственно.

Результаты показаны на фиг. 15. Молекулы из примеров 6 и 9 в эквиваленте 50 мг/кг соединения А (195 и 185 мг/кг дендримера соответственно) значимо ингибировали рост опухоли по сравнению с контролем со средой-носителем, при этом макромолекулы из примера 6 были немного эффективнее в качестве монотерапии, чем макромолекулы из примера 9 при 50 мг/кг соединения А (185 мг/кг молекулы из примера 9). В табл. 17 обобщены значения ингибирования роста опухоли (TIC) и задержки роста опухоли (T-C), рассчитанные как % ингибирования и % регрессии. Расчет основан на геометрическом среднем RTV в каждой группе.

В конкретный день для каждой экспериментальной группы рассчитывали значение ингибирования по формуле: % ингибирования = $(CG - TG) \times 100 / (CG - 1)$, в которой "CG" означает геометрическое среднее rtv контрольной группы, а "TG" означает геометрическое среднее относительного объема опухоли (rtv) экспериментальной группы. При расчете "CG" должна применяться соответствующая контрольная группа для экспериментальной группы. Если ингибирование >100%, то необходимо рассчитать регрессию по формуле: регрессия = $1 - TG$.

Значение TIC составляло 63,5% для эквивалента 50 мг/кг соединения А (195 мг/кг молекулы из примера 6), 40,44% для эквивалента 50 мг/кг соединения А (185 мг/кг молекулы из примера 9) и 75,27% для 10 мг/кг ритуксимаба. Таким образом, молекула из примера 6 и молекула из примера 9, вводимые дозой в эквиваленте 50 мг/кг соединения А, являются значимо активными в данной модели. Что еще более важно, комбинация молекул из примеров 6 и 9 в эквиваленте 10, 30 и 50 мг/кг соединения А с ритуксимабом (10 мг/кг) приводила к регрессии опухоли. Кроме того, комбинированная обработка приводила к полной регрессии опухоли у большинства животных, при этом такого не наблюдали при обработках одним лекарственным средством.

Таблица 17

Обобщенные данные касательно эффективности молекул из примеров 6 и 9
в комбинации с ритуксимабом

	Обработка	Эффективность			
		% ингибирования (TIC) День (41)	% регрессии, День (41)	P- значение День (41)	T-C (дни)
1	Среда-носитель				
2	Молекула из примера 6 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 195 мг/кг молекулы из примера 6)	63,5		0,0002	
3	Молекула из примера 9 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 185 мг/кг молекулы из примера 6)	40,44		0,0420	
4	Ритуксимаб (10 мг/кг)	75,27		0,0010	>16
5	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 6 (эквивалент 10 мг/кг соединения А, 39 мг/кг молекулы из примера 6)	>100	97	0,0005	>37

6	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 6 (эквивалент 30 мг/кг соединения А, 117 мг/кг молекулы из примера 6)	>100	100	<0,0001	>37
7	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 6 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 195 мг/кг молекулы из примера 6)	>100	100	<0,0001	>37
8	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 9 (эквивалент 10 мг/кг соединения А, 37 мг/кг молекулы из примера 9)	>100	69	0,0230	>37
9	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 9 (эквивалент 30 мг/кг соединения А, 111 мг/кг молекулы из примера 9)	>100	100	<0,0001	>37
10	Ритуксимаб (10 мг/кг) плюс молекула из примера 9 (эквивалент 50 мг/кг соединения А, 185 мг/кг молекулы из примера 9)	>100	100	<0,0001	>37

Пример 19. Телеметрические исследования сердечно-сосудистой системы на крысах.

Чтобы оценить эффекты соединения А и молекул из примеров 5, 6, 8 и 9 на артериальное давление, частоту сердечных сокращений, интервал QА и электрокардиограмму самцам крыс Han Wistar имплантировали хирургическим путем под анестезией телеметрические передатчики для грызунов от Data Sciences International. Телеметрические передатчики помещали в мышцу брюшной полости, а катетер артериального давления помещали в брюшную аорту. Электроды для ЭКГ пришивали к дорсальной поверхности мечевидного отростка и на переднее средостение.

После имплантации телеметрического передатчика отдельным группам крыс в хвостовую вену вводили однократную 30-минутную внутривенную инфузию соединения А или молекул из примеров 5, 6 или 8 (8 самцов/группа для соединения А и 3 самца/группа для каждого дендримера). Молекулу из примера 9 вводили отдельной группе крыс (3 самца/группа) в виде однократной внутривенной болюсной инъекции в хвостовую вену. Соединение А вводили при уровнях дозы 0 и 10 мг/кг. Молекулу из примера 6 вводили при уровнях дозы 0, 35, 70 и 105 мг/кг (эквивалент 10, 20 и 30 мг/кг соединения А), молекулы из примеров 5 и 8 вводили из расчета 0, 35 и 105 мг/кг (эквивалент 10 и 30 мг/кг соединения А), а молекулу из примера 9 вводили из расчета 0, 37 и 112 мг/кг (эквивалент 10 и 30 мг/кг соединения А).

Параметры сердечно-сосудистой системы регистрировали непрерывно с помощью приемных датчиков, размещенных под домашней клеткой, в течение по меньшей мере 1 ч перед введением дозы и вплоть до 72 ч после введения дозы. Отбирали образцы крови для определения уровня соединения А и всех дендримеров в плазме крови, вместе с тем проводили лабораторную диагностику и отбирали ограниченное количество тканей для гистопатологических исследований органа-мишени только у тех животных, которым вводили дозой макромолекулярные конструкции.

Инфузия соединения А очень тяжело переносилась и не позднее чем через 5 ч после начала инфузии обнаружили погибшими в общей сложности трех крыс. Все животные, которым вводили дозу дендримеров, выжили до запланированного завершения исследования. После введения соединения А отмечали двухфазное понижение систолического и среднего артериального кровяного давления в промежутке от 1,5 до 16 ч после начала инфузии, что сопровождалось увеличением частоты сердечных сокращений в промежутке от 2 до 10 ч после начала инфузии. Также через 1 ч после начала инфузии отмечали уменьшение амплитуды QRS, которое все еще наблюдалось в конце периода регистрации. Изменения показателей сердечнососудистой системы в случае молекулы из примера 6 ограничивались временным уменьшением амплитуды QRS в промежутке от 2 до 8 ч после введения дозы у животных, которым вводили дозу 120 мг/кг, с полным восстановлением через 22 ч после введения дозы. Для молекулы из примера 6 и всех других дендримеров изменения показателей сердечно-сосудистой системы не были обнаружены при введении дозы вплоть до 80 и 120 мг/кг соответственно.

У животных, которые получали ≥ 80 мг/кг молекулы из примера 6, повышались концентрации трансаминаз в плазме крови. У крыс, которым вводили дозу вплоть до 120 мг/кг молекул из примеров 5, 8 и 9, не отмечалось изменений концентрации трансаминаз. В случае введения всех дендримеров наблюдали тромбоцитопению, что согласуется с первичной фармакологией.

При введении ≥ 80 мг/кг молекулы из примера 6 гистопатологические проявления включали минимальный уровень дегенерации/некроза скелетных мышц, при этом проявления в сердце (минимальная степень апоптоза эндотелиальных клеток) и печени (минимальная степень апоптоза клеток печени) наблюдали также у животных, которым вводили дозу 120 мг/кг. Для молекулы из примера 9 гистопатологические проявления в скелетных мышцах (минимальный уровень дегенерации скелетных мышц) показаны при введении ≥ 40 мг/кг, а минимальную степень апоптоза клеток печени наблюдали только при введении 120 мг/кг. Для молекулы из примера 5 показано отсутствие гистопатологических изменений, связанных с обработкой, при введении вплоть до 120 мг/кг, при этом гистопатологические проявления в случае молекулы из примера 8 ограничивались минимальной степенью некроза клеток печени только при введении 120 мг/кг.

В заключение, эти данные иллюстрируют улучшенные профили гистопатологии сердечно-сосудистой системы и печени в случае молекул из примеров 5, 6, 8 и молекулы из примера 9 по сравнению с соединением А.

Таблица 18

Обобщенные результаты телеметрических исследований
сердечно-сосудистой системы у крыс после внутривенного введения
дозы соединения А и молекул из примеров 6 и 9

Параметр	Соединение А	Молекула из примера 6 ^a			Молекула из примера 9 ^a	
	10 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг	30 мг/кг	10 мг/кг	30 мг/кг
Прижизненное воздействие	3 животных погибло	Все уровни доз хорошо переносились			Все уровни доз хорошо переносились	
Тромбоциты	Не оценивали	↓	↓	↓	↓	↓
Трансаминазы	Не оценивали	NAD	↑	↑	NAD	NAD
Сердечно-сосудистая система	↓ амплитуды QRS ↓ кровяного давления ↑ частоты сердечных сокращений	NAD	NAD	↓ амплитуды QRS	NAD	NAD
Гистопатология	Не оценивали					
Дегенерация/некроз скелетных мышц		0/3	2/3	2/3	1/3	1/3
Сердце – апоптоз эндотелиальных клеток		0/3	0/3	1/3	0/3	0/3
Печень – апоптоз клеток печени		0/3	0/3	3/3	0/3	1/3

^a Уровни доз выражены как эквивалент соединения А.

NAD = отклонений не обнаружено.

Пример 20. Токсикологические исследования максимальной переносимой дозы на крысах и собаках.

Исследования максимально переносимой дозы (MTD) молекулы из примера 6 проводили на крысах и собаках. Молекулу из примера 6 вводили отдельным группам самцов или самок крыс Han Wistar (до 4/группа) путем внутривенной болюсной инъекции при уровнях дозы 125, 200, 225 и 250 мг/кг (эквивалент 31, 50, 56 и 62 мг/кг соединения А). MTD молекулы из примера 6 для крыс составляет 225 мг/кг (эк-

вивалент 56 мг/кг соединения А), что является 5-кратным увеличением по сравнению с соединением А отдельно.

Одному кобелю и одной суке породы Бигль молекулу из примера 6 вводили посредством внутривенной болюсной инъекции с еженедельным возрастанием доз 4, 8, 12, 20, 30 и 45 мг/кг (эквивалент 1, 2, 3, 5, 7,5 и 11 мг/кг соединения А). МТД молекулы из примера 6 для собак составляет 45 мг/кг (эквивалент 11 мг/кг соединения А), что является 11-кратным увеличением по сравнению с соединением А.

Исследование максимально переносимой дозы молекулы из примера 9 проводили на крысах. Молекулу из примера 9 вводили отдельным группам самцов крыс Han Wistar (3/группа) посредством внутривенной болюсной инъекции при уровнях дозы 125, 250, 500, 1000 и 1500 мг/кг (эквивалент 9, 72, 145, 290 и 435 мг/кг соединения А). МТД молекулы из примера 9 для крыс составляет 1000 мг/кг (эквивалент 290 мг/кг соединения А), что является 29-кратным увеличением по сравнению с соединением А.

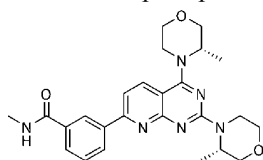
В заключение, эти данные иллюстрируют увеличение максимально переносимой дозы молекулы из примера 6 и молекулы из примера 9 по сравнению с соединением А отдельно.

Пример 21. Противоопухолевая активность *in vivo* отдельного средства и комбинации на модели опухоли мелкоклочного рака легкого человека.

Молекула из примера 9 и AZD2014 (вистусертиб, ингибитор mTOR, показанный ниже) индуцировали противоопухолевую активность в качестве отдельного средства и комбинации у мышей, несущих опухоль NCI-H1048 (фиг. 18). Еженедельное (qw) *iv* введение 103 мг/кг молекулы из примера 9 (эквивалентной 30 мг/кг соединения А) приводило к значительной противоопухолевой активности, составляющей 76% TGI ($p < 0,05$). Ежедневное (qd) ведение 15 мг/кг ингибитора mTOR, AZD2014, приводило к значительной противоопухолевой активности, составляющей 84% TGI ($p < 0,05$). Комбинация молекулы из примера 9 и AZD2014 приводила к 91% регрессии опухоли ($p < 0,05$ относительно активности отдельного средства).

Молекулу из примера 9 составляли в цитрат/фосфатном буфере с pH 5,0, содержащем 4,5% вес./об. глюкозы, и вводили дозой внутривенно (*iv*) в объеме 5 мл/кг. AZD2014 составляли в 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозе/0,1% Tween 80 и вводили дозой перорально в объеме 10 мл/кг.

5×10^6 опухолевых клеток NCI-H1048 вводили подкожной инъекцией в правый бок самок мышей C.B.-17 SCID в объеме 0,1 мл, содержащем 50% матригеля. Объем опухоли (измеренный штангенциркулем) рассчитывали с применением формулы: длина (мм) $\times$ ширина (мм)² $\times$ 0,52. Для исследований эффективности мышей рандомизировали на основе объема опухоли, а ингибирование роста оценивали путем сравнения отличий объема опухоли у контрольной и экспериментальной групп. Введение дозы начинали, когда средний объем опухоли достигал примерно 124 мм³.

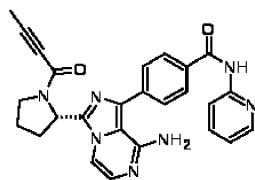


AZD2014

Пример 22. Противоопухолевая активность *in vivo* отдельного средства и комбинации на модели DLBcl человека.

5×10^6 опухолевых клеток OCI-Ly10 вводили подкожной инъекцией в правый бок самок мышей C.B.-17 SCID в объеме 0,1 мл, содержащем 50% матригеля. Молекулу из примера 9 составляли в цитрат/фосфатном буфере с pH 5,0, разбавленном 1:10 с помощью 5% раствора глюкозы, содержащего 1% вес./об. Kolliphor HS15, и вводили дозой как еженедельное внутривенное (*iv*) введение объемом 5 мл/кг в дозе 103 мг/кг (30 мг/кг API). Акалабрутиниб составляли в 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозе/0,2% Tween 80 и вводили дозой дважды в день (*bid*) как пероральное (*po*) введение объемом 10 мл/кг при дозе 12,5 мг/кг. Объемы опухоли (измеренные штангенциркулем), вес тела животного и состояние опухоли регистрировали дважды в неделю на протяжении исследования. Объем опухоли рассчитывали с применением формулы: длина(мм) $\times$ ширина(мм)² $\times$ 0,52. Для исследований эффективности ингибирование роста после начала обработки оценивали путем сравнения отличий объема опухоли у контрольной и экспериментальной групп. Введение дозы начинали, когда средний размер опухоли достигал примерно 166 мм³.

Как показано на фиг. 19, комбинирование молекулы из примера 9 с акалабрутинибом приводило к значительной противоопухолевой активности *in vivo* на модели с ксенотрансплантатом OCI-Ly10 DLBcl. Еженедельное *iv* введение 103 мг/кг молекулы из примера 9 (30 мг/кг соединения А) в комбинации с пероральным введением 12,5 мг/кг акалабрутиниба дважды в день приводило к полной регрессии у 8 из 8 мышей, несущих опухоль, через 10 дней после начала обработки. Полные регрессии сохранялись даже после окончания обработки (3-недельная обработка и 35 дней последующего наблюдения). В то же время молекула из примера 9 или акалабрутиниб как отдельное средство показали относительно небольшую активность отдельного средства с достижением примерно 64 и 58% ингибирования роста опухоли (TGI) соответственно.



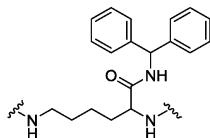
Акалабрутиниб

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

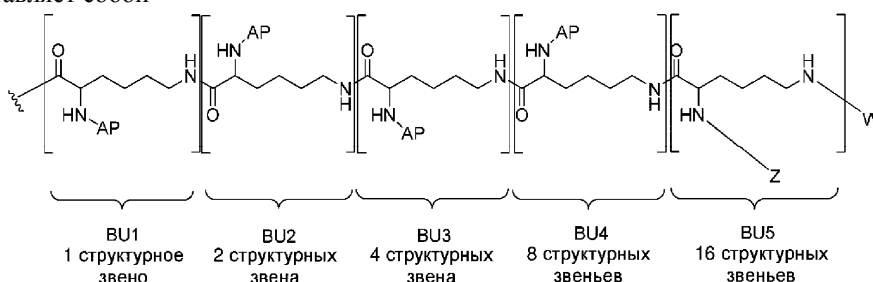
1. Дендример формулы (III)

D-ядро-D (III),

или его фармацевтически приемлемая соль,
где ядро представляет собой:



D представляет собой



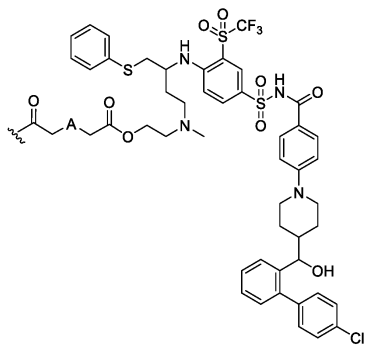
AP представляет собой точку прикрепления к другому структурному звену;

W независимо представляет собой (PM)_c или (H)_e;

Z независимо представляет собой (L-AA)_d или (H)_e;

PM представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀ или PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀;

L-AA представляет собой линкер, присоединенный ковалентной связью к активному средству; где L-AA представлен формулой



где A представляет собой -N(CH₃), -O-, -S- или -CH₂-;

при условии, что если (c+d)<64, то любые оставшиеся группы W и Z представляют собой (H)_e, где e составляет 64-(c+d), а d составляет ≥1.

2. Дендример по п.1, где PM представляет собой PEG₉₀₀₋₁₂₀₀.

3. Дендример по п.2, где A представляет собой -O-.

4. Дендример по п.1, где PM представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

5. Дендример по п.4, где A представляет собой -O-.

6. Дендример по п.4, где A представляет собой -(CH₂)₂-.

7. Дендример по п.4, где A представляет собой -S-.

8. Дендример по п.4, где A представляет собой -N(CH₃)₂-.

9. Дендример по любому из пп.4-8, где PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 2000 до приблизительно 2200 Да.

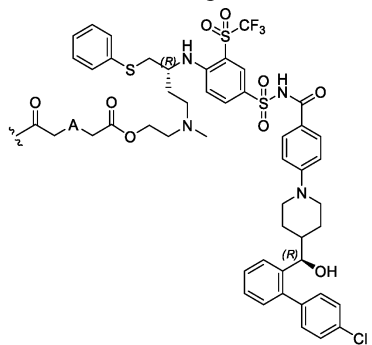
10. Дендример по п.9, где PEG характеризуется средней молекулярной массой приблизительно 2150 Да.

11. Дендример по любому из пп.1-10, где c составляет целое число от 25 до 32.

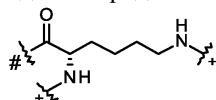
12. Дендример по п.11, где c составляет целое число от 29 до 32.

13. Дендример по п.12, где c составляет 29 или 30.

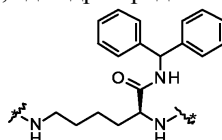
14. Дендример по любому из пп.1-13, где d составляет целое число от 25 до 32.
 15. Дендример по п.14, где d составляет целое число от 29 до 32.
 16. Дендример по п.15, где d составляет 32.
 17. Дендример по любому из пп.1-16, где (с+d) равняется целому числу от 50 до 64.
 18. Дендример по п.17, где (с+d) равняется целому числу от 58 до 64.
 19. Дендример по любому из пп.1-18, где e составляет целое число от 0 до 14.
 20. Дендример по п.19, где e составляет целое число от 0 до 6.
 21. Дендример по любому из пп.1-20, где L-AA представляет собой:



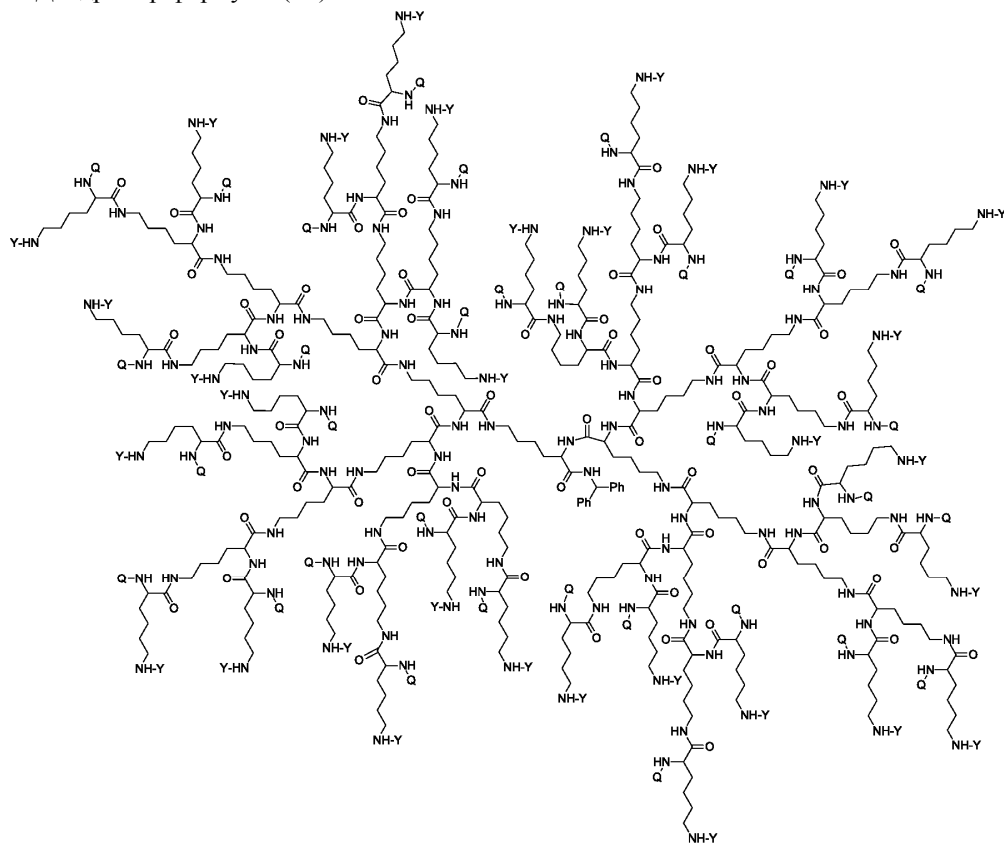
22. Дендример по любому из пп.1-20, где BU представляет собой:



23. Дендример по любому из пп.1-22, где ядро представляет собой:



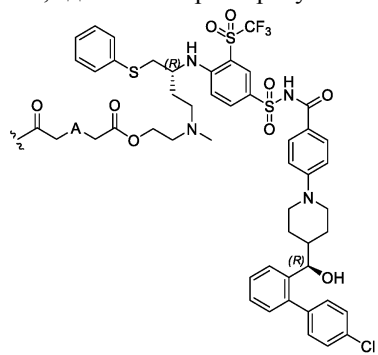
24. Дендример формулы (IV)



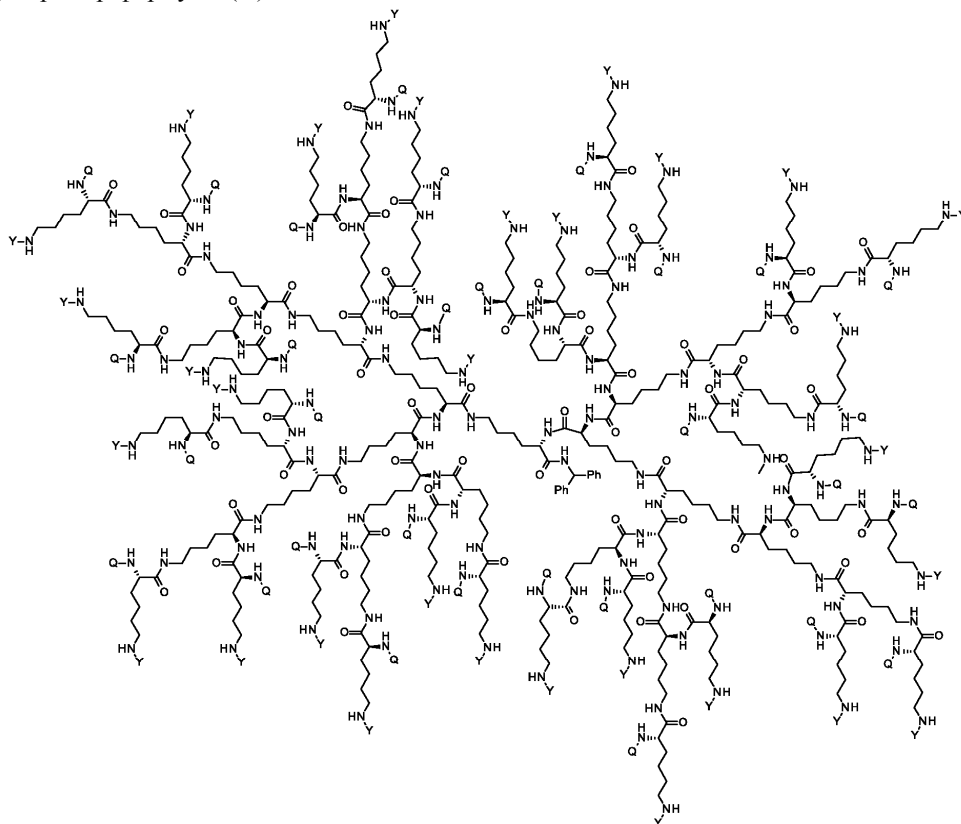
(IV),

или его фармацевтически приемлемая соль,
 где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;

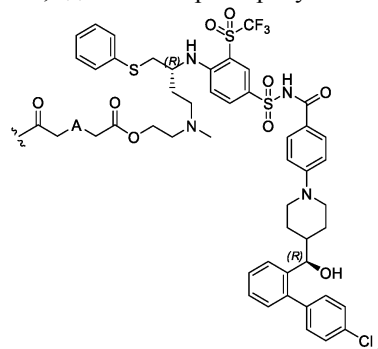
Q представляет собой H или L-AA, где L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),
при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.
25. Дендимер формулы (V)



(V),
или его фармацевтически приемлемая соль,
где Y представляет собой PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ или H;
Q представляет собой H или L-AA, где L-AA характеризуется структурой:



A представляет собой -S- или -N(CH₃),
при условии, что если сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет менее 64, то оставшиеся фрагменты Q и

Y представляют собой H, и при условии, что по меньшей мере один Q представляет собой L-AA.

26. Дендример по п.24 или 25, где A представляет собой -S-.

27. Дендример по п.24 или 25, где A представляет собой -N(CH₃).

28. Дендример по любому из пп.24-27, где сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет целое число от 50 до 64.

29. Дендример по п.28, где сумма PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀ и L-AA составляет целое число от 58 до 64.

30. Дендример по любому из пп.24-29, где дендример содержит от 25 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

31. Дендример по п.30, где дендример содержит от 29 до 32 PEG₁₈₀₀₋₂₄₀₀.

32. Дендример по любому из пп.24-31, где дендример содержит от 25 до 32 L-AA.

33. Дендример по п.32, где дендример содержит от 29 до 32 L-AA.

34. Дендример по любому из пп.24-33, где дендример содержит от 0 до 14 атомов водорода в положениях Q и/или Y.

35. Дендример по п.34, где дендример содержит от 0 до 6 атомов водорода в положениях Q и/или Y.

36. Дендример по любому из пп.24-35, где PEG характеризуется средней молекулярной массой от приблизительно 2000 до 2200 Да.

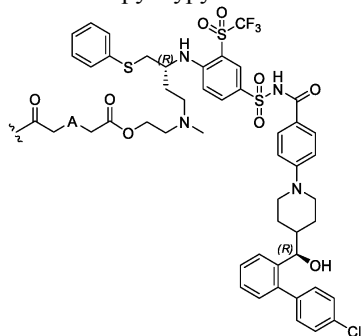
37. Дендример по любому из пп.1-36, где PEG характеризуется PDI от приблизительно 1,00 до 1,10.

38. Дендример по п.37, где PEG характеризуется PDI приблизительно 1,05.

39. Дендример по любому из пп.1-38, где дендример характеризуется молекулярной массой от приблизительно 90 до 120 кДа.

40. Дендример по п.39, где дендример характеризуется молекулярной массой от приблизительно 103 до 107 кДа.

41. Дендример по п.22, где L-AA имеет структуру:



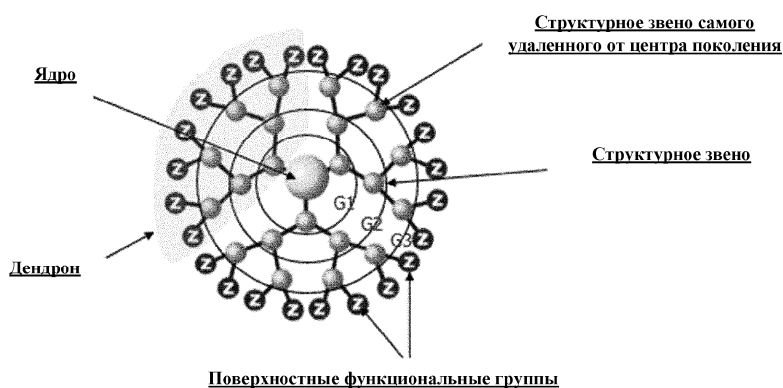
42. Фармацевтическая композиция, содержащая дендример по любому из пп.1-41 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

43. Способ лечения рака, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества дендримера по любому из пп.1-41 или его фармацевтически приемлемой соли.

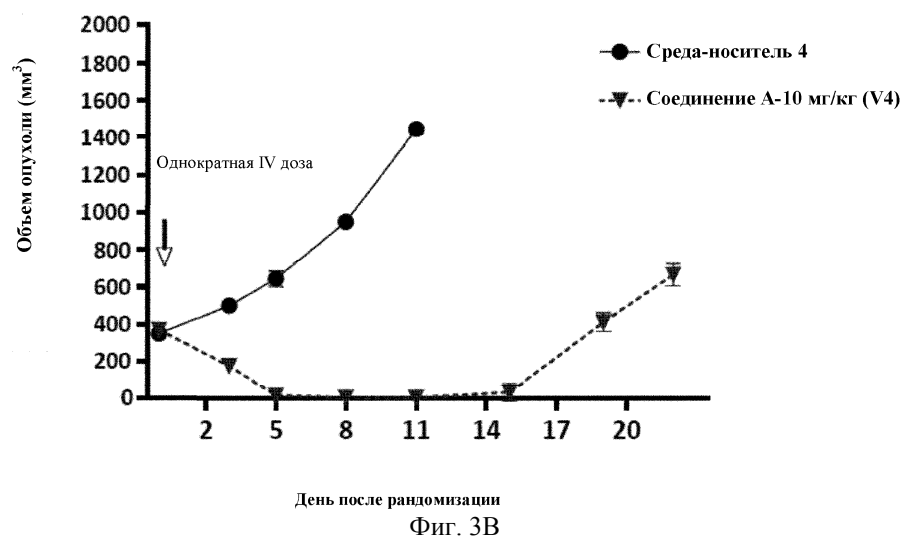
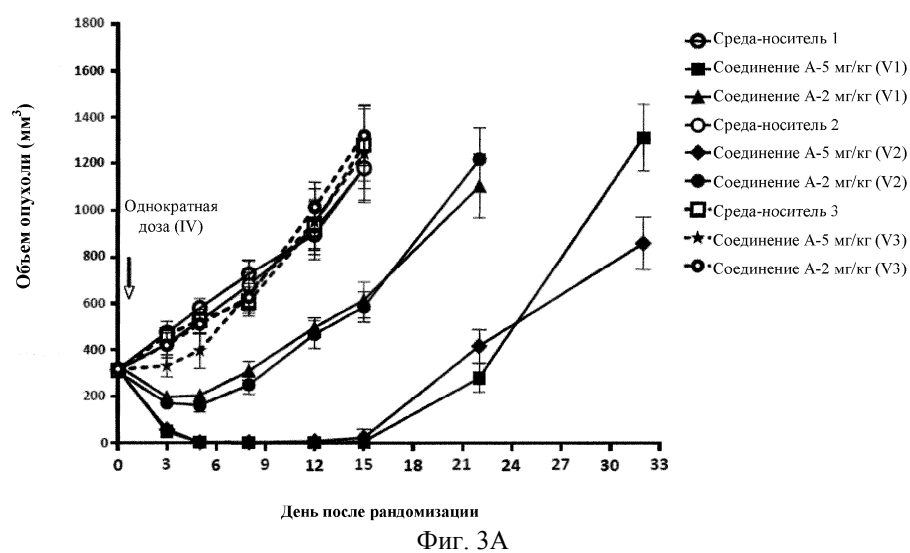
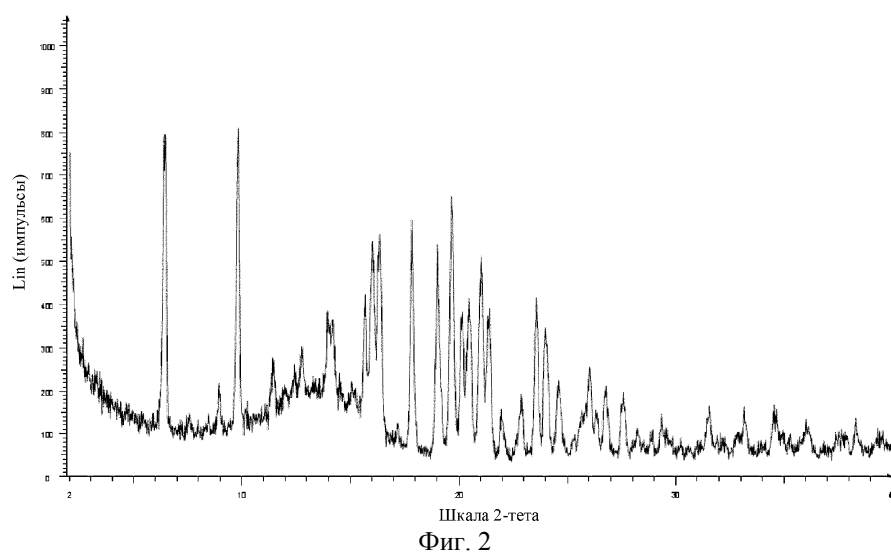
44. Применение дендримера по любому из пп.1-41 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака.

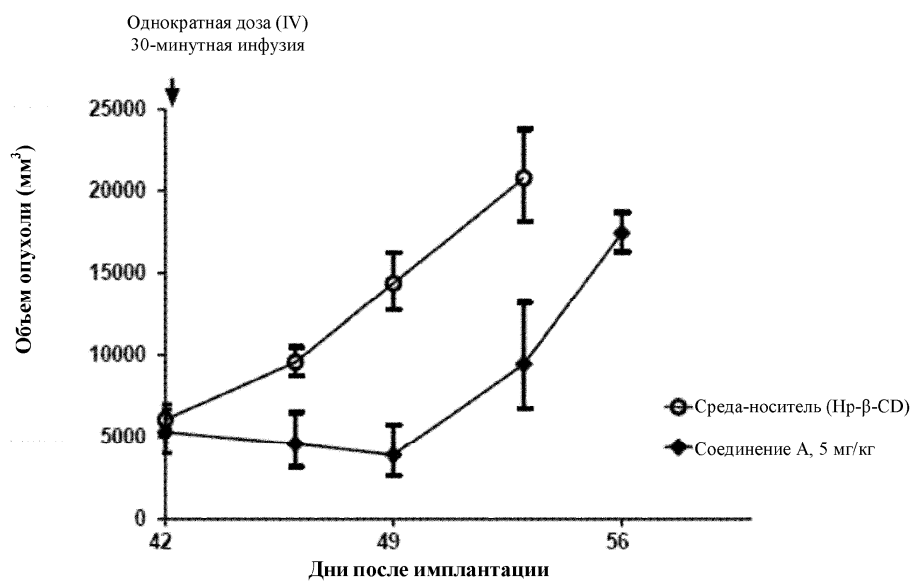
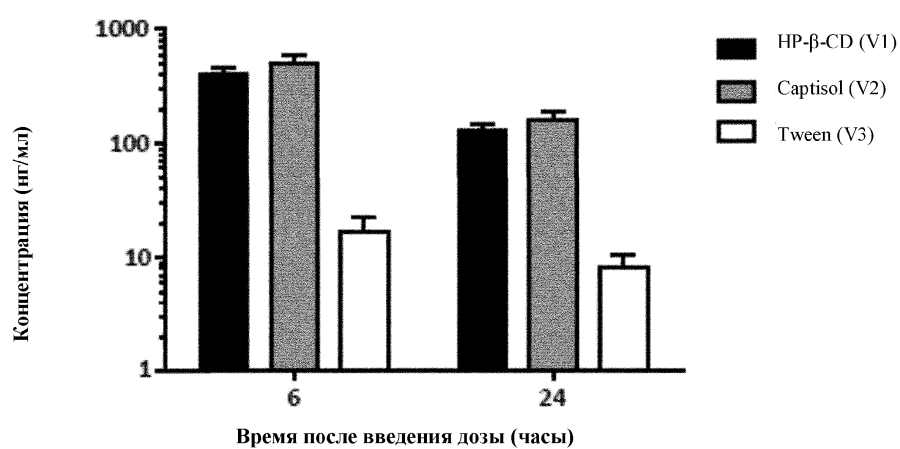
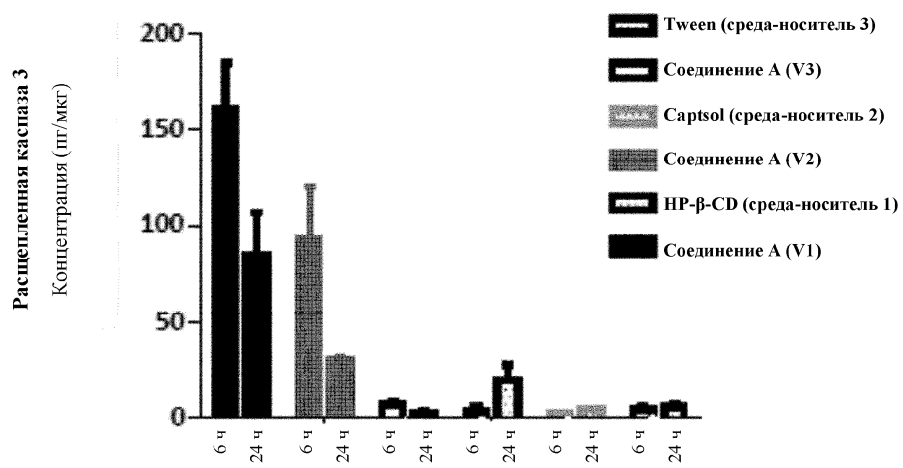
45. Применение дендримера по любому из пп.1-41 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

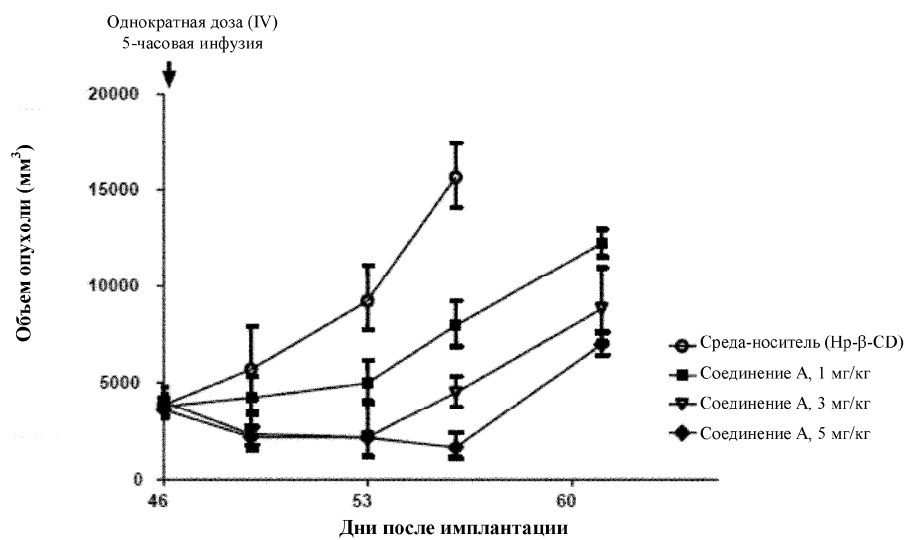
46. Применение фармацевтической композиции, содержащей дендример по любому из пп.1-41 или его фармацевтически приемлемую соль, для лечения рака.



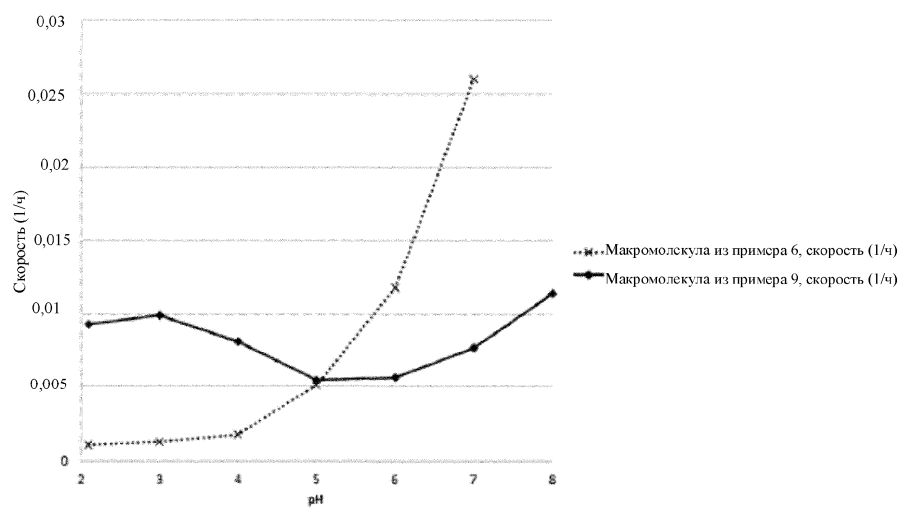
Фиг. 1



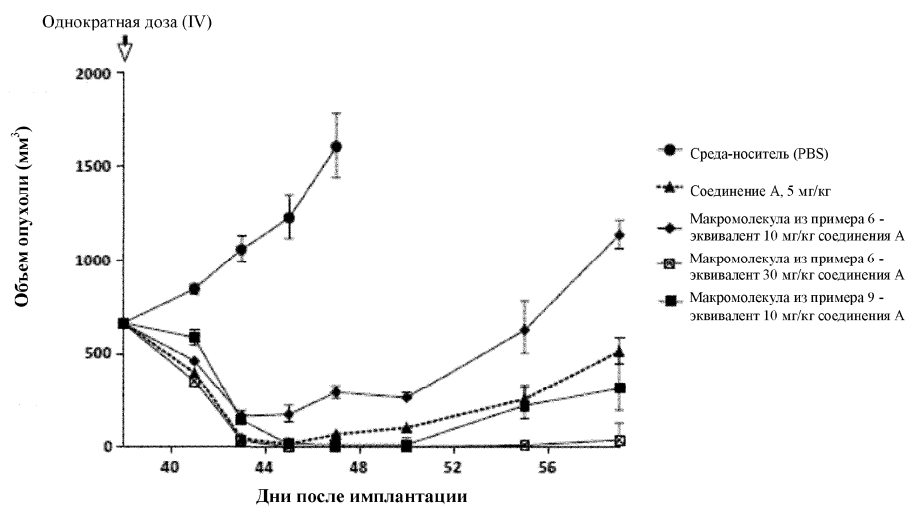




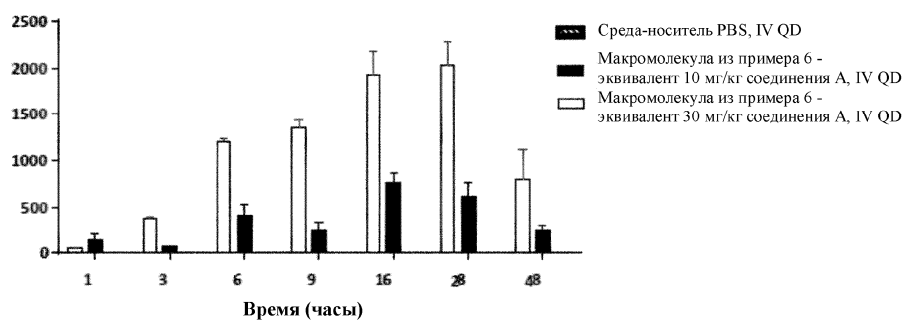
Фиг. 7



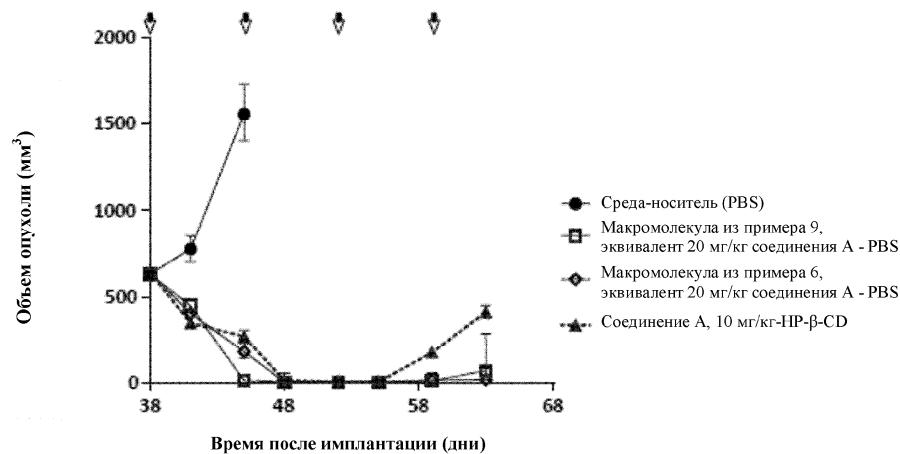
Фиг. 8



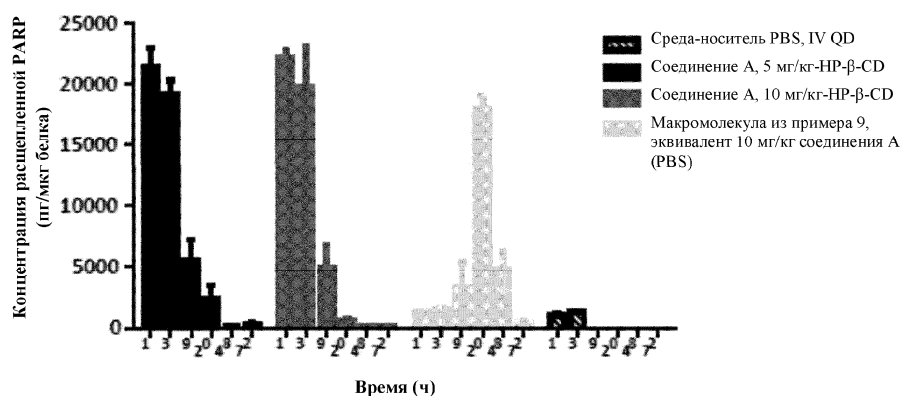
Фиг. 9



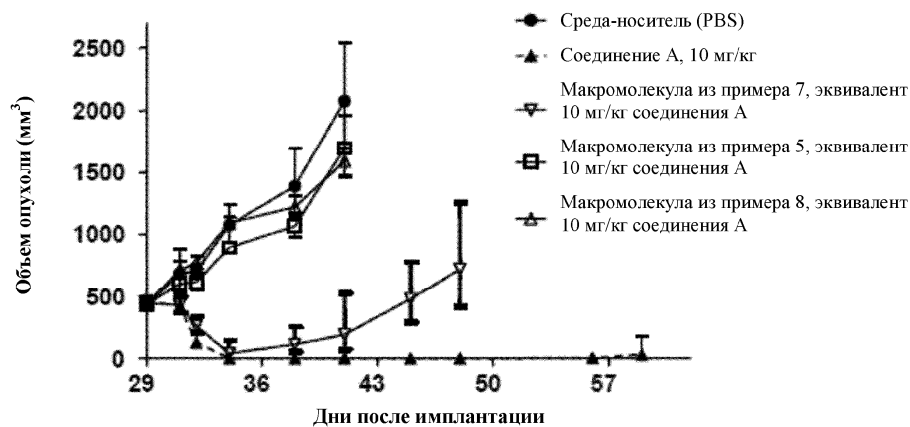
Фиг. 10



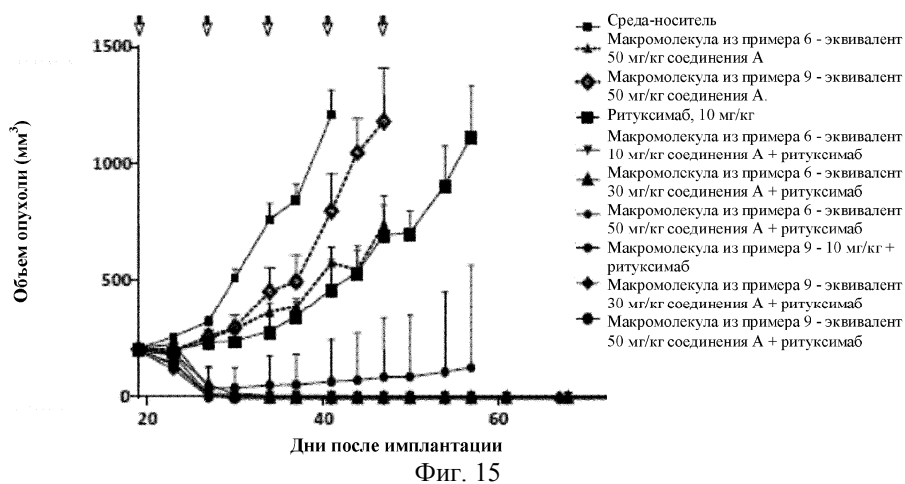
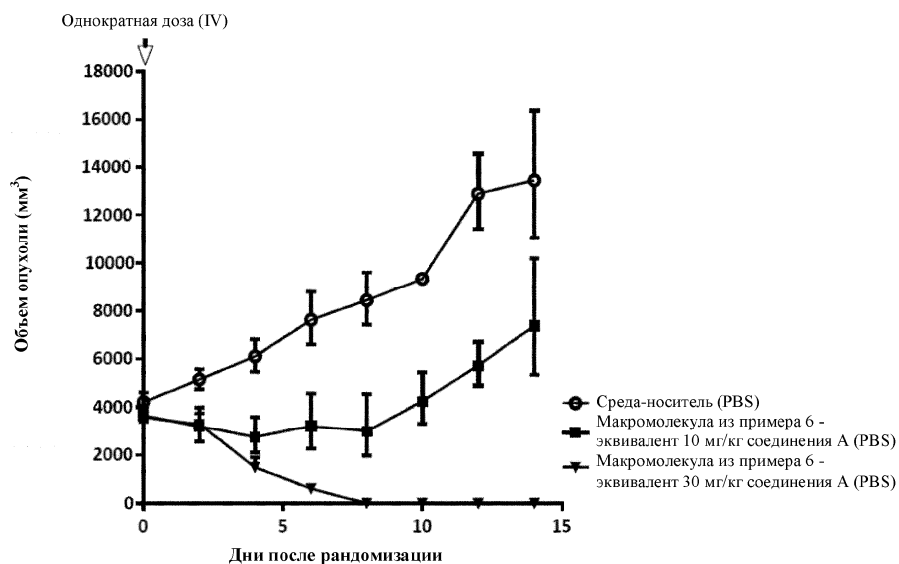
Фиг. 11

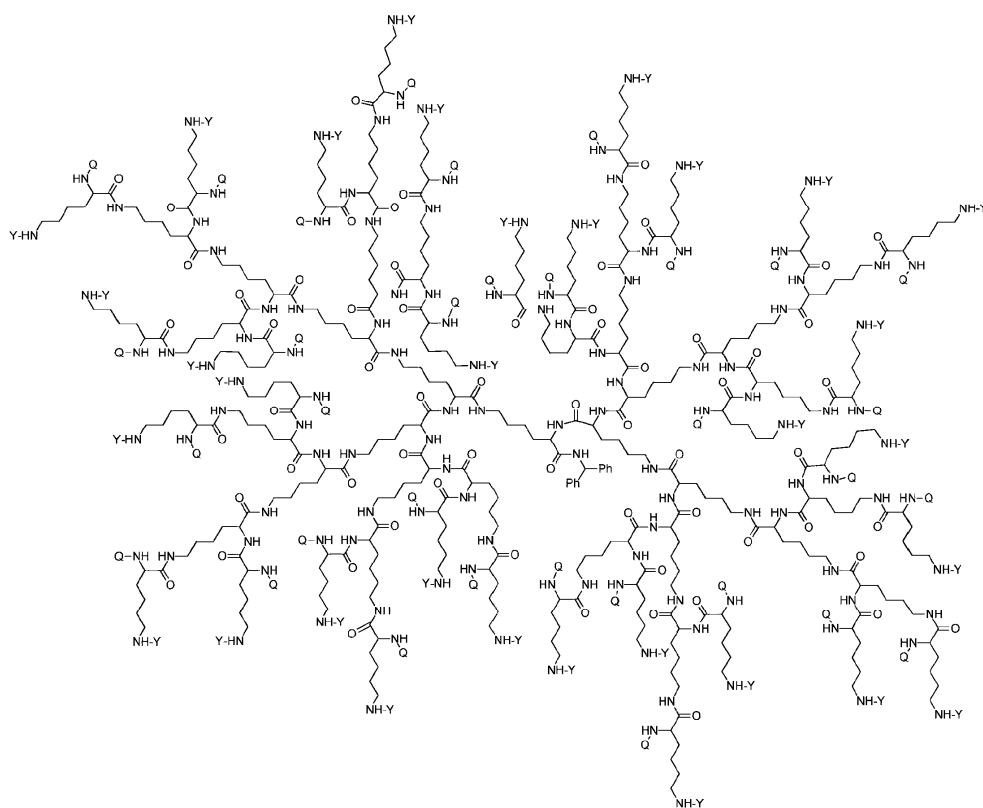


Фиг. 12

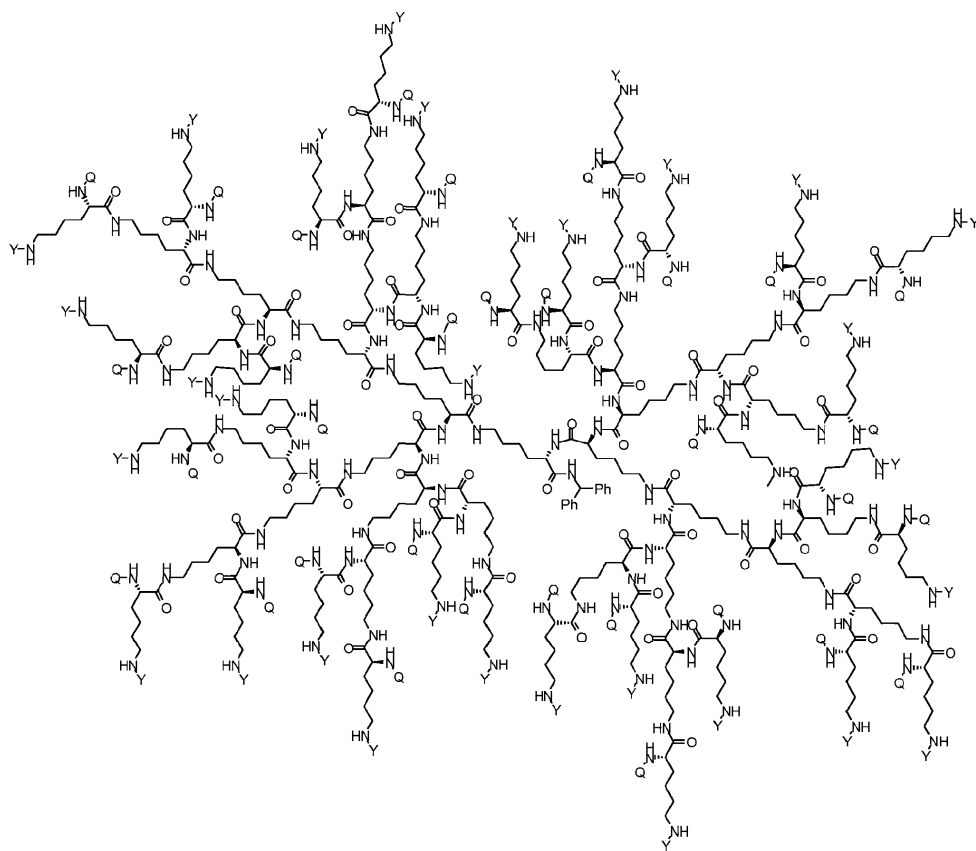


Фиг. 13

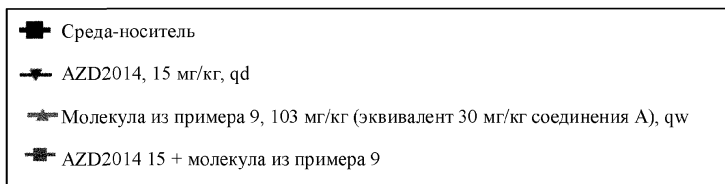




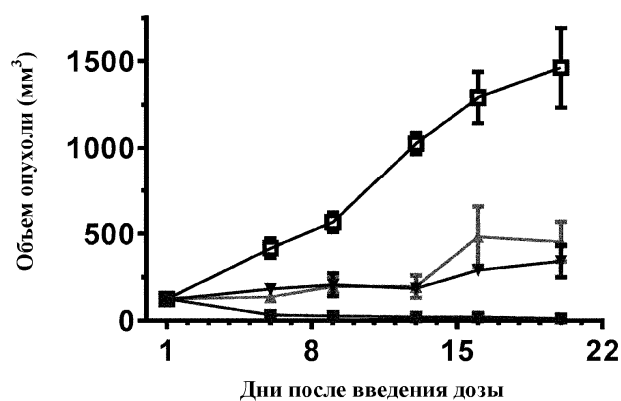
Фиг. 16



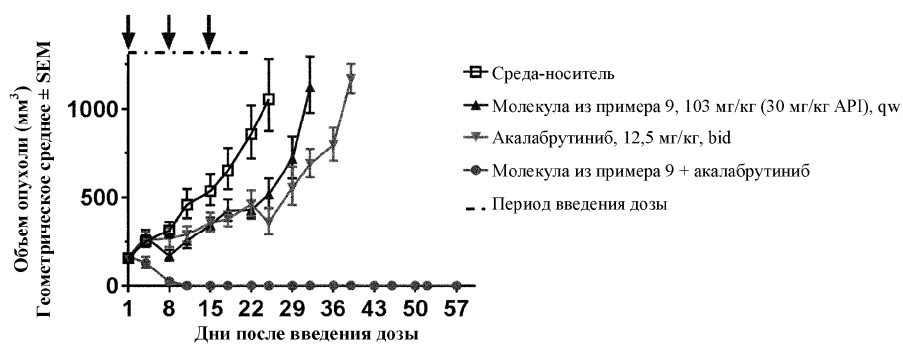
Фиг. 17



NCI-H1048



Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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