



(51) МПК

A61K 47/50 (2017.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/50 (2018.08); A61K 31/728 (2018.08); A61P 35/00 (2018.08); C08B 37/0072 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2016139420, 10.03.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2015Дата регистрации:
20.03.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.03.2014 CZ PV 2014-150

(43) Дата публикации заявки: 11.04.2018 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 20.03.2019 Бюл. № 8

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.10.2016

(86) Заявка РСТ:
CZ 2015/000018 (10.03.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/135511 (17.09.2015)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ(Интернэшнл) Инк.", Карпенко
Оксана Юрьевна

(72) Автор(ы):

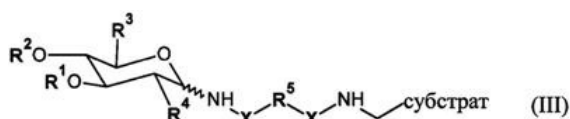
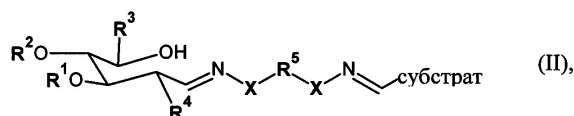
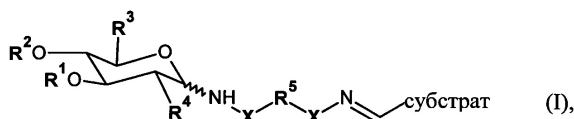
БУФФА Радован (SK),
БАСАРАБОВА Ивана (SK),
НЕСПОРОВА Кристина (CZ),
ЭХЛОВА Тереза (CZ),
КОТЛАНД Ондрей (CZ),
СЕДОВА Петра (CZ),
ХРОМЕК Леос (CZ),
ВЕЛЕБНЫ Владимир (CZ)(73) Патентообладатель(и):
КОНТИПРО А.С. (CZ)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007/101243 A1, 07.09.2007. WO 2005/092390 A2, 06.10.2005. WO 2014/023272 A1, 13.02.2014. WO 2011/069475 A2, 16.06.2011. THAKAR DHURUV ET AL. "A quartz crystal microbalance method to study the terminal functionalization of glycosaminoglycans", CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol.50, no.96, 2014, pp.15148-15151. RU 2411958 C2, 20.02.2011.

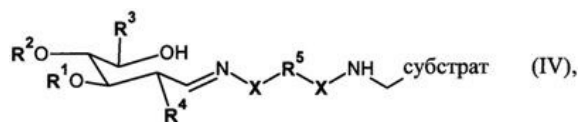
(54) КОНЬЮГАТЫ ОЛИГОМЕРА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ СОЛИ, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к конъюгату олигомера гиалуроновой кислоты или ее фармацевтически приемлемым солям согласно любой из общих формул I, II, III или IV:



ИЛИ



где R^1 - R^5 , X и субстрат определены в п.1 формулы. Также изобретение относится к способам получения указанных выше конъюгатов и к конъюгату олигомера гиалуроновой кислоты, выбранного из: конъюгата октасахарида ГК (ГК-8) с дигидразидадипатом, конъюгата трисахарида

ГК (ГК-3) с дигидразидадипатом, конъюгата октадека ГК (ГК-18) с дигидразидадипатом, конъюгата тетрасахарида ГК (ГК-4) с терефталойлдигидразидом. Технический результат – получение конъюгатов олигомера гиалуроновой кислоты или ее фармацевтически приемлемых солей, которые обеспечивают высвобождение олигомеров в их нативной форме и проявляют повышенную биологическую активность относительно выбранных линий раковых клеток. 4 н. и 16 з.п. ф-лы, 1 ил., 12 пр.

RU 2 6 8 2 5 0 9 C 2

RU 2 6 8 2 5 0 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 47/50 (2017.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 47/50 (2018.08); A61K 31/728 (2018.08); A61P 35/00 (2018.08); C08B 37/0072 (2018.08)

(21)(22) Application: 2016139420, 10.03.2015

(24) Effective date for property rights:
10.03.2015Registration date:
20.03.2019

Priority:

(30) Convention priority:
11.03.2014 CZ PV 2014-150

(43) Application published: 11.04.2018 Bull. № 11

(45) Date of publication: 20.03.2019 Bull. № 8

(85) Commencement of national phase: 11.10.2016

(86) PCT application:
CZ 2015/000018 (10.03.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/135511 (17.09.2015)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG(Interneshnl) Ink.", Karpenko
Oksana Yurevna

(72) Inventor(s):

BUFFA Radovan (SK),
BASARABOVA Ivana (SK),
NESPOROVA Kristina (CZ),
EHLOVA Tereza (CZ),
KOTLAND Ondrej (CZ),
SEDOVA Petra (CZ),
HROMEK Leos (CZ),
VELEBNY Vladimir (CZ)

(73) Proprietor(s):

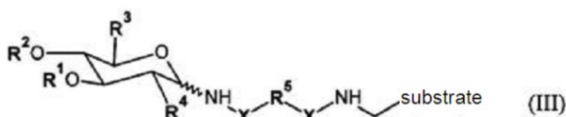
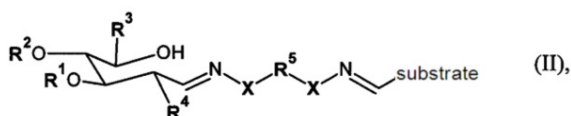
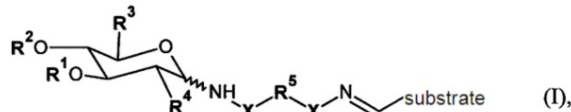
CONTIPRO A.S. (CZ)

(54) CONJUGATES OF OLIGOMER OF HYALURONIC ACID OR SALT THEREOF, METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF

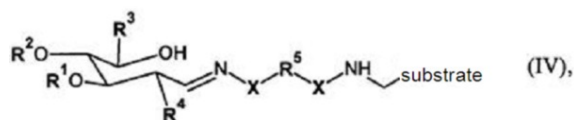
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to conjugate of hyaluronic acid oligomer or its pharmaceutically acceptable salts according to any of general formulas I, II, III or IV:



or



where R^1 - R^5 , X and substrate are defined in claim 1. Invention also relates to methods of producing said conjugates and to a hyaluronic acid oligomer conjugate, selected from: conjugate of octasaccharide GK (GK-8) with dihydrazid adipate, conjugate of GK (GK-3)

trisaccharide with dihydrazid adipate, conjugate of octadec GK (GK-18) with dihydrazidipate, conjugate of GK (GK-4) tetrasaccharide with terephthaloyl dihydrazide.

EFFECT: technical result is obtaining conjugates of hyaluronic acid oligomer or its pharmaceutically acceptable salts, which provide release of oligomers in their native form and show increased biological activity relative to selected lines of cancer cells.

20 cl, 1 dwg, 12 ex

R U 2 6 8 2 5 0 9 C 2

R U 2 6 8 2 5 0 9 C 2

Область техники

Настоящее изобретение относится к конъюгатам гиалуроновой кислоты или ее соли, способу их получения и их применению.

Посредством таких конъюгатов можно иммобилизовать олигомеры гиалуроновой кислоты с возможностью их высвобождения в их исходной, нативной форме.

Уровень техники

Гиалуроновая кислота представляет собой гликозаминогликан, состоящий из двух повторяющихся сахаридных циклов β -(1,3)-D-глюкуроновой кислоты и β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамина.

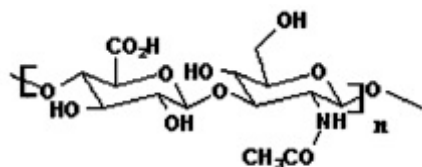


Схема 1: Гиалуроновая кислота

Она характеризуется высокой молекулярной массой от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ г·моль⁻¹, которая зависит от способа ее выделения и исходного материала. Этот очень гидрофильный полисахарид является водорастворимым в форме соли во всем диапазоне pH. Он образует часть соединительных тканей, кожи, синовиальной жидкости суставов, он играет важную роль в ряде биологических процессов, таких как гидратация, организация протеогликанов, клеточная дифференцировка, пролиферация и ангиогенез.

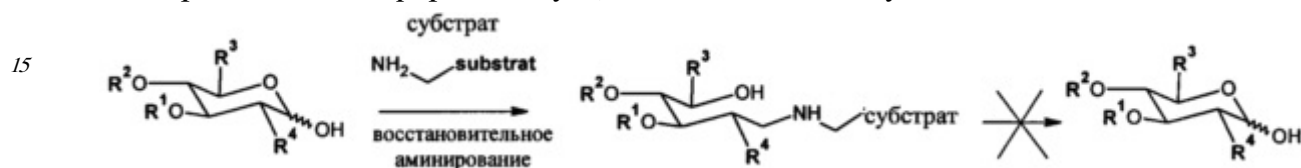
Связывание олигомеров гиалуроновой кислоты (ГК)

Как указано выше, нативная гиалуроновая кислота является линейным полисахаридом, который разлагается в организме достаточно быстро. Первые весомые попытки получения гиалуроновой кислоты с разветвленной структурой были описаны в 2008 г. Toemmerase K. (WO 2008/014787). Этот документ относится к связыванию аминокислоты деацетилированной гиалуроновой кислоты с высокой молекулярной массой с концевым аномерным центром олигомера гиалуроновой кислоты посредством восстановительного аминирования. Авторы другого патентного документа, Hacker M., Saraf A., Mikos A.G., WO 2008/115799, действовали аналогичным образом в случае связывания концевого аномерного центра олигомера ГК с полиэтиленгликолем. Для обеспечения сильной связи используют восстановительное аминирование, которое превращает аминокислоты в гидролитически очень устойчивые вторичные амины. Реакция происходит в слабощелочной среде и при повышенной температуре, и цианоборгидрид натрия используют в качестве восстанавливающего средства. Полученные конъюгаты использовали для инкапсуляции ДНК или мезенхимальных стволовых клеток, причем только гексамер указывают в качестве олигомера гиалуроновой кислоты. Другая возможность была раскрыта в статье в Eur. J. Org. Chem. 2011, 5617-25. Здесь аминокислота образуется в положении 6 глюкозаминной части олигомера ГК, причем аминокислота затем реагирует при умеренных условиях с NHS-сложными эфирами карбоновых кислот, связанных с углеродными нанотрубками. Связывание концевого аномерного центра гиалуроновой кислоты с низкой молекулярной массой посредством диамино- или полиаминолинкера при помощи восстановительного аминирования раскрыто Xu (WO 2007/101243). Полученные субстраты использовали для инкапсулирования активных веществ. Другая возможность была раскрыта Carter (US 2012/0277416), где фосфолипиды связывали с концевым аномерным центром олигомера ГК. На первой стадии производное олигомера с амином в положении 1 получали посредством восстановительного аминирования, затем его

конъюгировали с активной карбоксильной группой фосфолипида. Полученные конъюгаты проявляли широкий диапазон биологических активностей. Аналогичная процедура связывания с олигомером ГК с аминогруппой на восстановленном аномерном конце была опубликована Siiskonen в 2013 г., где маркер 2-аминоакридон связывали.

5 Указанный конъюгат использовали для изучения биораспределения фрагментов гиалуроновой кислоты в цитозоле.

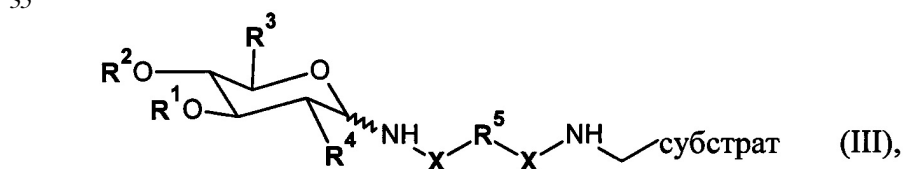
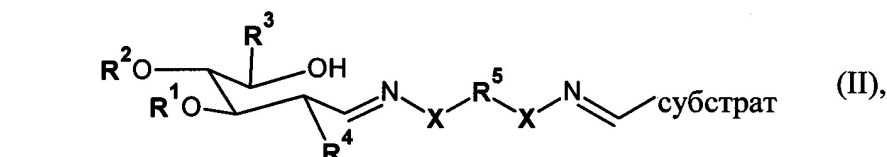
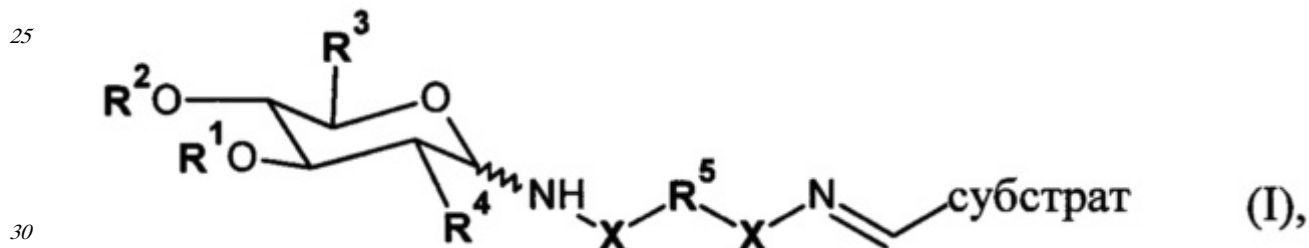
Недостатком вышеуказанных способов является тот факт, что они обеспечивают образование конъюгатов олигомеров или полимеров ГК, которые не позволяют их дальнейшее высвобождение в нативной форме. Причиной этого является тот факт, что
10 все известные на данный момент способы связывания аминов с концевым аномерным центром связаны с восстановлением, т.е. с необратимым изменением концевой цикла, который остается навсегда открытым и не позволяет обратное высвобождение олигомера в нативной форме. Ситуация показана на следующей схеме 1:



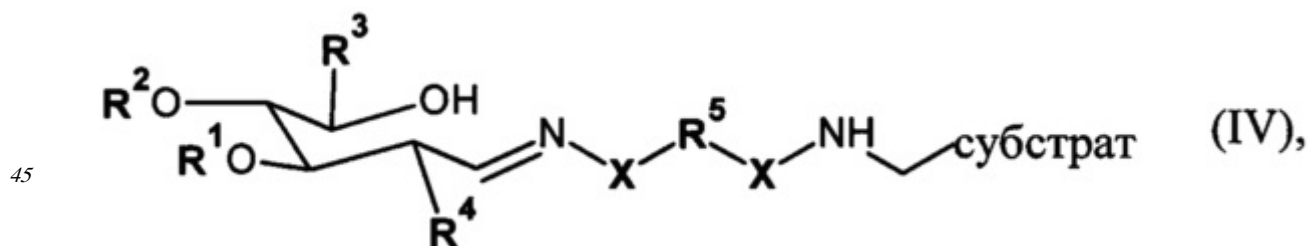
Объект настоящего изобретения

20 Вышеуказанные недостатки преодолеваются конъюгатами олигомеров ГК с общими формулами I, II, III или IV согласно настоящему изобретению, которые позволяют такое обратное высвобождение олигомеров ГК в нативной форме.

Объектом настоящего изобретения является конъюгат олигомера гиалуроновой кислоты или ее соли, соответствующий любой из общих формул I, II, III или IV,



или



где

R^3 представляет собой $COOR^6$ или CH_2OH ,

R^4 представляет собой OH или $NHCOCH_3$,

R^6 представляет собой H^+ или выбран из группы, содержащей любой из ионов щелочных металлов или ионов щелочноземельных металлов, предпочтительно Na^+ , K^+ , Mg^{2+} или Li^+ ;

R^5 выбран из группы, содержащей C_1 - C_{30} алкил, C_1 - C_{30} алкиларил или C_1 - C_{30} алкилгетероарил, необязательно содержащий один или несколько одинаковых или различных гетероатомов, выбранных из группы, содержащей N, O, S,

X представляет собой O или NH-группу;

когда R^3 представляет собой $COOR^6$, тогда R^4 представляет собой OH , R^1 представляет собой H, R^2 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой кислоты;

когда R^3 представляет собой CH_2OH , тогда R^4 представляет собой $NHCOCH_3$, R^2 представляет собой OH , R^1 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой кислоты;

субстрат представляет собой полисахарид, предпочтительно он выбран из группы, содержащей гиалуроновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль с молекулярной массой в диапазоне от 10^4 до 10^6 г·моль⁻¹, предпочтительно 10^5 г·моль⁻¹.

Структура полученных конъюгатов зависит в большей степени от характера заместителя X. Если X представляет собой кислородный мостик -O-, в основном присутствует иминоформа. Если X представляет собой азотный мостик -NH-, преобладающей формой является аминок с бета-конфигурацией.

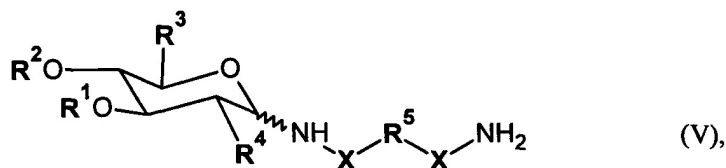
Остаток олигомера гиалуроновой кислоты в конъюгате согласно настоящему изобретению имеет 1-17 сахаридных циклов, причем сахаридный цикл выбран из группы, состоящей из β -(1,3)-D-глюкуроновой кислоты и β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамина.

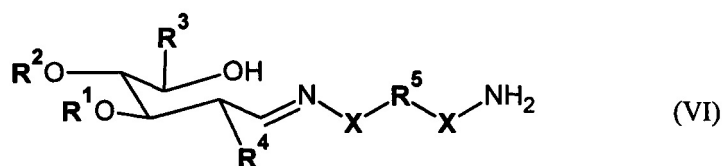
Согласно другому варианту осуществления конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты с общими формулами I и II, определенными выше, можно получать способом настоящего изобретения, сущностью которого является то, что на первой стадии олигомер гиалуроновой кислоты реагирует на его концевом аномерном центре в

положении 1 с избытком диаминолинкера общей формулы $H_2N-X-R^5-X-NH_2$, где R^5

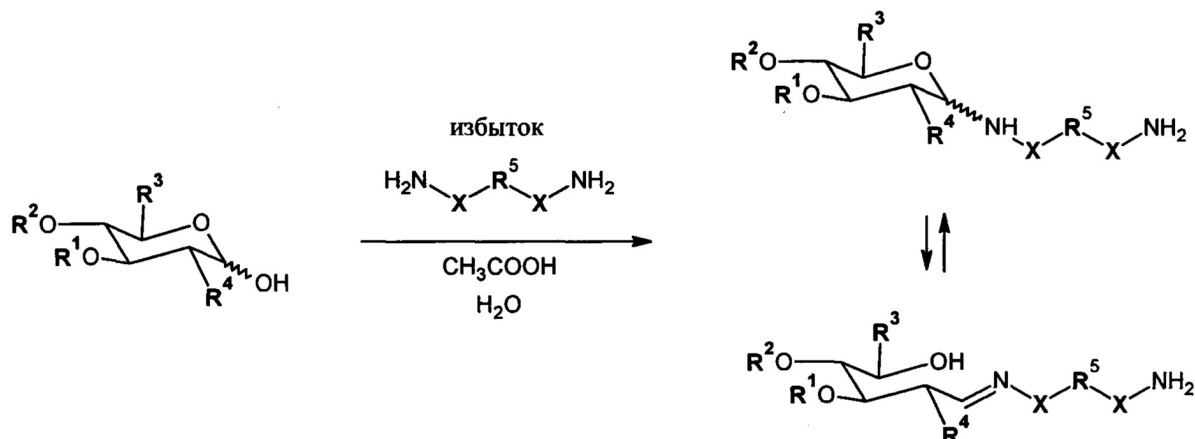
выбран из группы, содержащей C_1 - C_{30} алкил, C_1 - C_{30} алкиларил или

C_1 - C_{30} алкилгетероарил, который необязательно содержит один или несколько одинаковых или различных гетероатомов, выбранных из группы, содержащей N, O, S, а X представляет собой O или NH-группу; в слабо кислой среде при pH в диапазоне от 3 до 6,99, предпочтительно при pH в диапазоне от 3 до 6, более предпочтительно от 5 до 6, после чего выделяют конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты-диаминолинкера с общими формулами V и VI





где заместители R^1 - R^6 являются такими, как определено выше.
Осуществление первой стадии реакции показано на схеме 2 ниже.
Схема 2:



Реакция происходит при избытке диаминолинкера, который статистически исключает в значительной мере модификацию на обоих концах линкера.

Неожиданно обнаружили, что данная реакция происходит только в присутствии некоторого количества слабой кислоты и воды. Если условия были нейтральными или основными, никакой успешной реакции не наблюдали. Если присутствовала сильная кислота, такая как HCl или H₂SO₄, происходило разложение олигомеров ГК.

Слабокислотную среду с pH в диапазоне от 3 до 6,99 обеспечивают добавлением карбоновой кислоты в реакционную среду, предпочтительно уксусной кислоты, пропановой кислоты или молочной кислоты, более предпочтительно уксусной кислоты.

Количество кислоты находится в диапазоне от 5 до 30 эквивалентов, предпочтительно в диапазоне от 10 до 15 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты в качестве субстрата.

Кроме того, количество диаминолинкера находится в диапазоне от 5 до 30 эквивалентов, предпочтительно 10 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты в качестве субстрата.

Кроме того, первая стадия происходит при температуре от 10 до 40°C, предпочтительно при температуре 20°C, в течение 24-150 часов, предпочтительно 60-80 часов.

Затем происходит вторая стадия реакции, на которой конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты - диаминолинкера с общими формулами V и VI, как определено выше, реагируют по меньшей мере с одной альдегидной группой субстрата в воде или в смеси воды и смешиваемого с водой органического растворителя, который выбран из группы, содержащей этанол, изопропанол, метанол или диметилсульфоксид.

Кроме того, вторую стадию проводят при температуре от 10 до 40°C, а также предпочтительно при 20°C, в течение 24-150 часов, предпочтительно 60-80 часов.

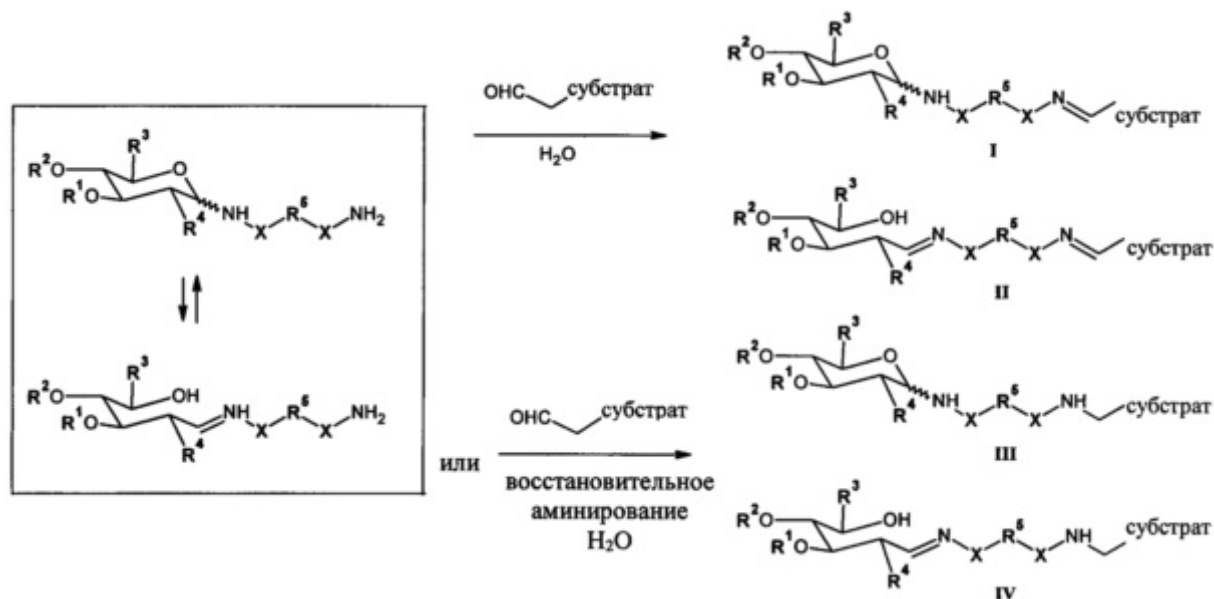
Согласно другому предпочтительному варианту осуществления способа настоящего изобретения конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты - диаминолинкера, соответствующие общим формулам V и VI, как определено выше, приводят в реакцию

в соответствии со способом и условиями, указанными выше, с по меньшей мере одной альдегидной группой субстрата в присутствии восстанавливающего средства, которое предпочтительно выбрано из группы, содержащей цианоборгидрид (NaBH_3CN) или пиколинборан, с образованием конъюгатов с общими формулами III и IV, где субстрат связывается гидролитически очень сильной связью.

Количество восстанавливающего средства находится в диапазоне от 0,1 до 5 эквивалентов, предпочтительно 3 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты.

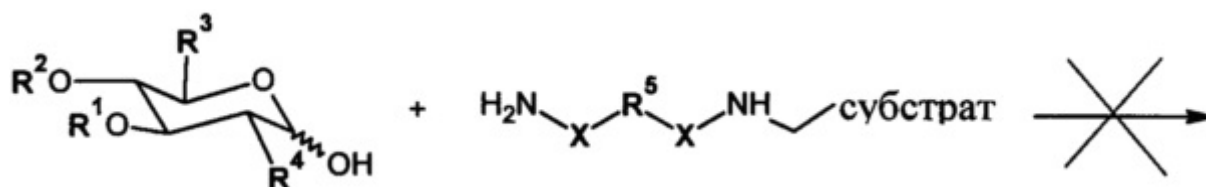
Обе вышеописанные возможности связывания субстрата путем аминирования или восстановительного аминирования показаны на схеме 3

Схема 3



Неожиданно, что при восстановительном аминировании, при котором образуются конъюгаты с общими формулами III и IV (смотрите схему выше), восстановление происходит по существу только по связи субстрат-линкер, что происходит из-за компромиссных условий, таких как температура реакции, время, количество восстанавливающего средства, и не наблюдали восстановления связи олигомер-линкер, которая также в принципе имеет характер восстановительного имина.

Попытки связывания конечного аномерного центра олигомера ГК с конъюгатом субстрата-линкера не были успешными даже при более высоких температурах, когда происходило расщепление олигомеров ГК



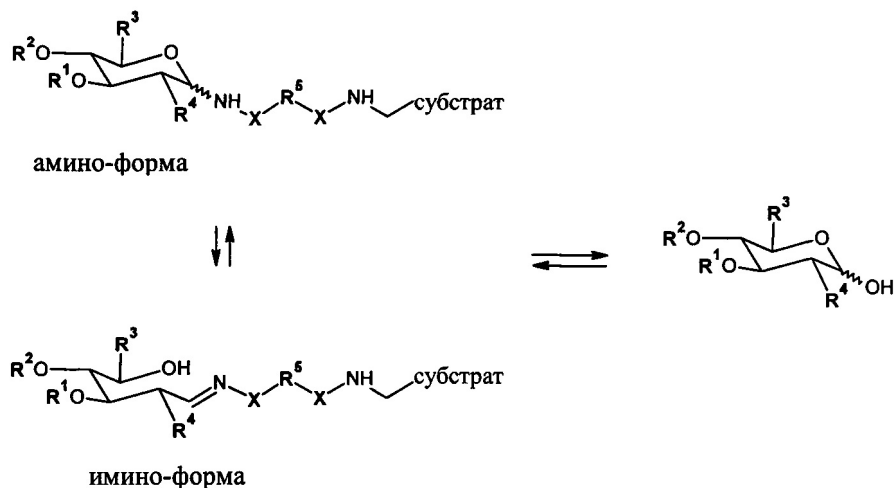
Таким образом, при получении конечного конъюгата необходимо связывать двухфункциональный линкер сначала с олигомером.

Из вышеуказанных фактов следует, что при получении конъюгатов согласно настоящему изобретению, было необходимо найти условия реакции, которые наконец нашли в относительно узком диапазоне (pH в области слабой кислоты, осторожное восстановление...). Конечные конъюгаты с общими формулами I, II, III, IV обеспечивают при сравнении с растворами, известными до этого, высвобождение олигомеров

гиалуроновой кислоты в их исходной нативной форме, что важно в отношении их биологической активности. Необходимое условие состоит в том, чтобы субстрат содержал альдегидные группы, которые можно достаточно легко получать химической модификацией, например, окислением в случае полисахаридов, содержащих ОН-группы.

Реализация решений, раскрытых в настоящем изобретении, не является сложной технологически и не требует использования дорогостоящих химических веществ, растворителей или процедур выделения.

Как уже описано выше, конъюгат согласно настоящему изобретению обеспечивает высвобождение:



Возможность обратимой иммобилизации является очень важной в случаях, где необходимо сохранять исходную структуру олигомеров ради их биологической активности или биосовместимости. Известно, что некоторые типы олигомеров ГК проявляют биологическую активность, например, к раковым клеткам. Полученные системы проявляли повышенную биологическую активность относительно выбранных линий раковых клеток.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения конъюгаты с общими формулами I-IV, как определено выше, предпочтительно используют в качестве носителей биологически активных олигомеров в фармацевтике и биомедицине, или возможно их использовать для получения материалов с противораковым действием.

Выражение «фармацевтически приемлемая соль» при использовании в настоящем документе означает соли конъюгатов ГК согласно настоящему изобретению, которые безопасны и эффективны для применения в организме и характеризуются желаемой биологической активностью. Фармацевтически приемлемые соли включают предпочтительно ионы щелочных металлов или щелочноземельных металлов, более предпочтительно Na^+ , K^+ , Mg^+ или Li^+ .

Выражение «полисахарид» означает полисахарид, такой как гиалуроновая кислота, ее фармацевтически приемлемая соль, крахмал, гликоген, целлюлоза и пр., которые содержат по меньшей мере одну альдегидную группу после окисления их ОН-групп.

Выражение «конъюгат» означает соединение, которое образуется путем связывания двух или более химических соединений посредством ковалентной связи. Конъюгат согласно настоящему изобретению образуется путем связывания олигомера ГК и линкера, давая конъюгат олигомера ГК-линкера, а затем путем их связывания с субстратом, т.е. полисахаридом, предпочтительно гиалуроновой кислотой, при этом образуя конъюгат олигомера ГК-линкера-субстрата.

Выражение «олигомер гиалуроновой кислоты» означает олигомер гиалуроновой

кислоты, содержащий попеременно повторяющиеся сахаридные циклы β -(1,3)-D-глюкуроновой кислоты и β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамина. Предпочтительно, число сахаридных циклов составляет от 2 до 18.

Выражение «остаток олигомера гиалуроновой кислоты» означает по меньшей мере один сахаридный цикл олигомера гиалуроновой кислоты, который представляет собой β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамин или β -(1,3)-D-глюкуроновую кислоту.

Когда концевой сахаридный цикл, связанный с линкером посредством его аномерного центра, представляет собой β -(1,3)-D-глюкуроновую кислоту, указанный сахаридный цикл представляет собой β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамин.

Когда концевой сахаридный цикл, связанный с линкером посредством его аномерного центра, представляет собой β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамин, указанный сахаридный цикл представляет собой β -(1,3)-D-глюкуроновую кислоту.

Когда остаток олигомера гиалуроновой кислоты содержит более одного сахаридного цикла, сахаридные циклы β -(1,3)-D-глюкуроновой кислоты и β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамина повторяются попеременно.

Выражение «избыток» означает количество диаминолинкера, которое больше, чем один эквивалент, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты в качестве субстрата.

Выражение «выделяют» означает, что после окончания реакции реакционную смесь нейтрализуют и осадившийся продукт реакции отфильтровывают и сушат.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан ход ингибирования роста иммортализованных раковых клеток в процентах относительно непораженного контроля.

Примеры

Выражение эквивалент (экв.), используемое в настоящем документе, относится к дисахариду гиалуроновой кислоты, если не указано другое. Проценты означают массовые проценты, если не указано другое.

Молекулярная масса исходной гиалуроновой кислоты (источник: CPN spol. s r.o., Долни Доброуч, Чехия) представляет собой среднемассовую молекулярную массу в диапазоне от 10^4 до 10^6 г·моль⁻¹ и была измерена SEC-MALS.

Олигомеры гиалуроновой кислоты, содержащие 2-18 сахаридных циклов, получали путем ферментативного разложения полимера с высокой молекулярной массой.

$DS = \text{степень замещения} = 100\% \cdot (\text{мольное количество связанного замещенного или модифицированного дисахарида}) / (\text{мольное количество всех дисахаридов})$

Пример 1. Получение ГК-альдегида, окисленного в положении 6 глюкозаминовой части

Окисление гиалуроновой кислоты

Водный раствор NaClO (0,5 экв.) постепенно добавляли в однопроцентный водный раствор гиалуроновой кислоты (1 г, 200 кДа), содержащий 1% NaCl, TEMPO (0,01 экв.) и NaHCO₃ (5 экв.), в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение 12 часов при температуре 0°C, затем 0,1 г этанола добавляли и смесь перемешивали еще 1 час. Полученный раствор затем разбавляли дистиллированной водой до 0,2% и диализировали относительно смеси (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO₃) 3 раза по 5 литров (раз в день) и относительно дистиллированной воды 7 раз по 5 литров (дважды в день). Затем полученный раствор выпаривали и анализировали.

DS 10% (определенный из ЯМР)

¹H-ЯМР (D₂O) 5,26 (s, 1H, полимер-CH(OH)₂)

HSQC (D₂O) перекрестный сигнал 5,26 частей на миллион (¹H) - 90 частей на миллион (¹³C) (полимер-CH(OH)₂)

Пример 2. Получение конъюгата октасахарида ГК (ГК-8) с дигидразидадипатом
 5 Октасахарид ГК растворяли в воде в концентрации 5%. Затем добавляли дигидразидадипат (6 эквивалентов) и уксусную кислоту (15 эквивалентов) и смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 72 часов при pH 4. Полученную смесь нейтрализовали при помощи NaHCO₃ и повторно осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

10 ¹H-ЯМР (D₂O) 4,24 (d, J=9,7 Гц, 1H, -O-CH-NH-бета), нет сигнала исходного концевых аномерного центра (-O-CH-OH альфа)

Пример 3. Получение конъюгата трисахарида ГК (ГК-3) с дигидразидадипатом
 Трисахарид ГК (оканчивающийся глюкуроновой кислотой) растворяли в воде в
 15 концентрации 7%. Затем добавляли дигидразидадипат (25 эквивалентов) и уксусную кислоту (25 эквивалентов) и смесь перемешивали при температуре 10°C в течение 150 часов при pH 6. Полученную смесь нейтрализовали при помощи NaHCO₃ и повторно осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

20 ¹H-ЯМР (D₂O) 4,11 (d, J=8,8 Гц, 1H, -O-CH-NH-бета), нет сигнала исходного концевых аномерного центра (-O-CH-OH альфа)

Пример 4. Получение конъюгата октадека ГК (ГК-18) с дигидразидадипатом
 Октадекасахарид ГК (оканчивающийся глюкозамином) растворяли в воде в
 25 концентрации 5%. Затем добавляли дигидразидадипат (15 эквивалентов) и уксусную кислоту (20 эквивалентов) и смесь перемешивали при температуре 40°C в течение 24 часов при pH 5. Полученную смесь нейтрализовали при помощи NaHCO₃ и повторно осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

30 ¹H-ЯМР (D₂O) 4,10 (d, J=8,7 Гц, 1H, -O-CH-NH-бета).

Пример 5. Получение конъюгата декасахарида ГК (ГК-10) с O,O'-1,3-пропандиилбисгидроксиламином

Декасахарид ГК растворяли в воде в концентрации 3%. Затем добавляли O,O'-1,3-пропандиилбисгидроксиламин (5 эквивалентов) и молочную кислоту (5 эквивалентов)
 35 и смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 100 часов при pH 6. Полученную смесь нейтрализовали при помощи NaHCO₃ и повторно осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

40 ¹H-ЯМР (D₂O) 7,53 (d, J=5,3 Гц, 1H, -O-CH=N-Z-изомер), 6,89 (d, J=6,0 Гц, 1H, -O-CH=N-E-изомер).

Пример 6. Получение конъюгата тетрасахарида ГК (ГК-4) с терефталойлдигидразидом

Тетрасахарид ГК растворяли в воде в концентрации 3%. Затем добавляли терефталойлдигидразид (5 эквивалентов) и пропановую кислоту (6 эквивалентов) и
 45 смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 100 часов при pH 6. Полученную смесь нейтрализовали при помощи NaHCO₃ и повторно осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

^1H -ЯМР (D_2O) 4,12 (d, $J=8,8$ Гц, 1H, -O-CH-NH-бета).

Пример 7. Связывание конъюгата ГК-8 - дигидразидадипата (пример 2) с гиалуроновой кислотой, окисленной в положении 6 до альдегида (пример 1), восстановительным аминированием

0,01 г конъюгата, полученного согласно примеру 2, растворяли в воде в концентрации 2%. Затем добавляли 0,01 г производного гиалуроновой кислоты, содержащего альдегид (молекулярная масса 6×10^5 г·моль $^{-1}$), и 5 эквивалентов пиколинборана. Смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 24 часов. Полученную смесь осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

^1H -ЯМР (D_2O) 2,85, 3,12 (m,m диастереотопическая пара, 2H, -NH-CH $_2$ -полимер)

DOSY-ЯМР (D_2O) 4,24 (d, $J=9,7$ Гц, 1H, -O-CH-NH-бета) имел такую же подвижность, как гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой, и сигналы диастереотопических водородов 2,85 и 3,12.

Пример 8. Связывание конъюгата ГК-3 - дигидразидадипата (пример 3) с гиалуроновой кислотой, окисленной в положении 6 до альдегида (пример 1), восстановительным аминированием

0,01 г конъюгата, полученного согласно примеру 3, растворяли в воде в концентрации 2%. Затем добавляли 0,01 г производного гиалуроновой кислоты, содержащего альдегид (молекулярная масса 2×10^4 г·моль $^{-1}$), и 0,3 эквивалента цианоборгидрида натрия. Смесь перемешивали при температуре 10°C в течение 72 часов. Полученную смесь осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

^1H -ЯМР (D_2O) 2,89, 3,04 (m,m диастереотопическая пара, 2H, -NH-CH $_2$ -полимер)

DOSY-ЯМР (D_2O) 4,11 (d, $J=8,8$ Гц, 1H, -O-CH-NH-бета) имел такую же подвижность, как гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой, и сигналы диастереотопических водородов 2,89 и 3,04.

Пример 9. Связывание конъюгата ГК-8 - дигидразидадипата (пример 2) с гиалуроновой кислотой, окисленной в положении 6 до альдегида (пример 1), без восстановления

0,1 г конъюгата, полученного согласно примеру 2, растворяли в смеси воды / ДМСО в отношении 1/1 в концентрации 2%. Затем добавляли 0,1 г производного гиалуроновой кислоты, содержащего альдегид (молекулярная масса 2×10^4 г·моль $^{-1}$). Смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 72 часов. Полученную смесь осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

^1H ЯМР (D_2O) 7,48 (m, 1H, -N=CH-полимер)

DOSY-ЯМР (D_2O) 4,24 (d, $J=9,7$ Гц, 1H, -O-CH-NH-бета) имел такую же подвижность, как гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой, и сигнал 7,48.

Пример 10. Связывание конъюгата ГК-18 - дигидразидадипата (пример 4) с гиалуроновой кислотой, окисленной в положении 6 до альдегида (пример 1), без восстановления

0,1 г конъюгата, полученного согласно примеру 4, растворяли в воде в концентрации 2%. Затем добавляли 0,1 г производного гиалуроновой кислоты, содержащего альдегид (молекулярная масса 2×10^4 г·моль $^{-1}$). Смесь перемешивали при температуре 10°C в течение 100 часов. Полученную смесь осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

^1H -ЯМР (D_2O) 7,47 (m, 1H, -N=CH-полимер)

DOSY-ЯМР (D_2O) 4,25 (d, $J=9,7$ Гц, 1H, -O-CH-NH-бета) имел такую же подвижность, как гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой, и сигнал 7,47.

Пример 11. Связывание конъюгата ГК-10 - O,O'-1,3-пропандиилбисгидроксиламина (пример 5) с гиалуроновой кислотой, окисленной в положении 6 до альдегида (пример 1), без восстановления

0,01 г конъюгата, полученного согласно примеру 5, растворяли в воде в концентрации 2%. Затем добавляли 0,01 г производного гиалуроновой кислоты, содержащего альдегид (молекулярная масса 2×10^4 г·моль $^{-1}$). Смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 48 часов. Полученную смесь осаждали посредством изопропилового спирта. Готовый твердый продукт сушили под вакуумом.

DOSY-ЯМР (D_2O) 7,53 (d, $J=5,3$ Гц, 1H, -O-CH=N-Z-изомер), 6,89 (d, $J=6,0$ Гц, 1H, -O-CH=N-E-изомер) имел такую же подвижность, как гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой.

Пример 12. Биологическое тестирование конъюгата, полученного согласно примеру 8

Определение жизнеспособности линии A2058 после обработки конъюгатом, полученным согласно примеру 8.

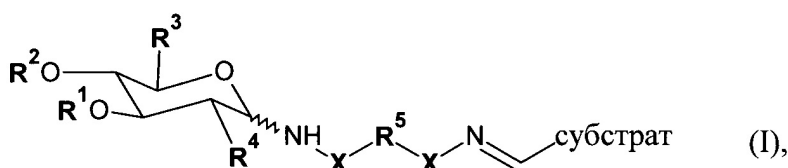
Клеточную линию, культивируемую при стандартных условиях (средний DMEM с 10% FBS, 37°C, 5% CO_2), высевали в 4 96-луночных культуральных планшета с плотностью 5000 клеток на лунку и инкубировали в 200 мкл среды в течение 24 часов. Затем культуральную среду заменяли на свежую среду, содержащую конъюгат (пример 8) в концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл. Среду для контрольных клеток заменяли на свежую среду без конъюгата. Сразу после обработки жизнеспособность клеток измеряли в первом планшете посредством МТТ-теста. Вкратце, 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) добавляли к клеткам и вместе их инкубировали в течение 2,5 часов в темноте при 37°C. После инкубации культуральную среду отсасывали и монослой клеток лизировали смесью ДМСО и изопропанола (1:1) с 10% Triton X-100. Полученный цвет в отдельных лунках планшета измеряли посредством спектрометра для планшетов (оптическая плотность при 570 нм с поправкой при 690 нм). Это измерение повторяли на других планшетах также каждые 24 часа. Конечную жизнеспособность рассчитывали как отношение оптической плотности образца в данное время и во время T_0 .

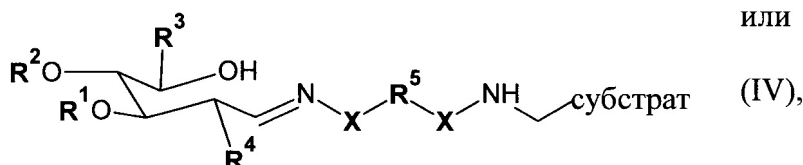
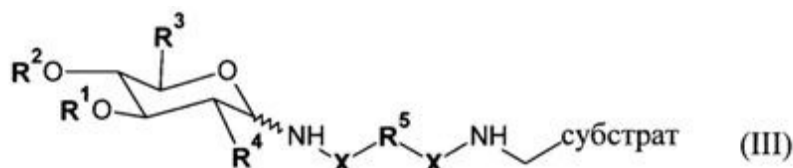
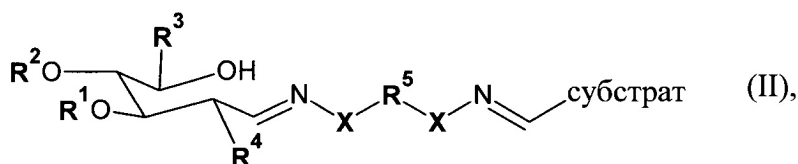
A2058 представляет собой иммортализованную клеточную линию, полученную из меланомы человека, она очень инвазивна, и по этой причине ее часто используют в качестве модели онкогенеза и метастазирования.

Результаты ингибирования роста клеток в процентах показаны на фиг. 1, где ясно, что ингибирование роста клеток повышается по экспоненте со временем из-за воздействия конъюгата согласно настоящему изобретению.

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат олигомера гиалуроновой кислоты или ее фармацевтически приемлемые соли согласно любой из общих формул I, II, III или IV





где

R^3 представляет собой COOR^6 или CH_2OH ,

R^4 представляет собой OH или NHCOCH_3 ,

R^6 представляет собой H^+ или выбран из группы, содержащей любой из ионов щелочных металлов или ионов щелочноземельных металлов, предпочтительно Na^+ , K^+ , Mg^{2+} или Li^+ ;

R^5 выбран из группы, содержащей $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкил, $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкиларил или $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкилгетероарил, необязательно содержащий один или несколько атомов O ;
 X представляет собой O или NH -группу;

когда R^3 представляет собой COOR^6 , R^4 представляет собой OH , R^1 представляет собой H , R^2 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой кислоты;

когда R^3 представляет собой CH_2OH , R^4 представляет собой NHCOCH_3 , R^2 представляет собой OH , R^1 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой кислоты;

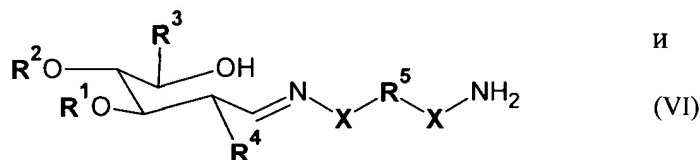
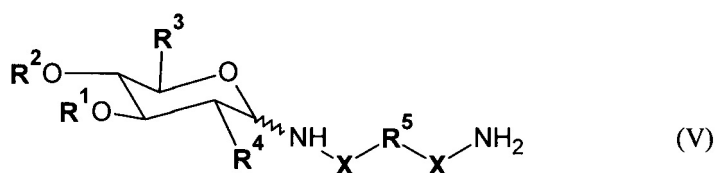
остаток олигомера гиалуроновой кислоты содержит 1-17 сахаридных циклов, причем сахаридный цикл выбран из группы, состоящей из $\beta\text{-(1,3)-D}$ -глюкуроновой кислоты и $\beta\text{-(1,4)-N}$ -ацетил- D -глюкозамина;

субстрат представляет собой полисахарид.

2. Конъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что полисахарид выбран из группы, содержащей гиалуроновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

3. Конъюгат по п. 2, характеризующийся тем, что гиалуроновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль характеризуются молекулярной массой в диапазоне от 10^4 до 10^6 г·моль⁻¹, предпочтительно 10^5 г·моль⁻¹.

4. Способ получения конъюгатов олигомера гиалуроновой кислоты с общими формулами I и II, определенными в п. 1, характеризующийся тем, что конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты-диаминолинкера с общими формулами V и VI



где

R^3 представляет собой COOR^6 или CH_2OH ,

15 R^4 представляет собой OH или NHCOCH_3 ,

R^6 представляет собой H или фармацевтически приемлемую соль;

R^5 выбран из группы, содержащей $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкил, $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкиларил или $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ алкилгетероарил, необязательно содержащий один или несколько одинаковых
20 или различных гетероатомов, выбранных из группы, содержащей N , O , S ;

X представляет собой O или NH -группу;

когда R^3 представляет собой COOR^6 , тогда R^4 представляет собой OH , R^1
представляет собой H , R^2 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой кислоты;

25 когда R^3 представляет собой $\text{-CH}_2\text{OH}$, тогда R^4 представляет собой NHCOCH_3 , R^2
представляет собой OH , R^1 представляет собой остаток олигомера гиалуроновой
кислоты;

остаток олигомера гиалуроновой кислоты содержит 1-17 сахаридных циклов, причем
30 сахаридный цикл выбран из группы, состоящей из $\beta\text{-(1,3)-D-}$ глюкуроновой кислоты и
 $\beta\text{-(1,4)-N-}$ ацетил- D- глюкозамина;

приводят в реакцию по меньшей мере с одной альдегидной группой субстрата в воде
или в смеси воды и смешиваемого с водой растворителя.

5. Способ получения по п. 4, характеризующийся тем, что субстрат представляет
35 собой полисахарид, предпочтительно выбранный из группы, содержащей гиалуроновую
кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

6. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что гиалуроновая кислота или ее
фармацевтически приемлемая соль характеризуются молекулярной массой в диапазоне
от 10^4 до 10^6 г·моль $^{-1}$, предпочтительно 10^5 г·моль $^{-1}$.

40 7. Способ получения по любому из пп. 4-6, характеризующийся тем, что его проводят
при температуре от 10 до 40°C, предпочтительно при температуре 20°C, в течение 24-
150 ч, предпочтительно 60-80 ч.

8. Способ получения по любому из пп. 4-7, характеризующийся тем, что смешиваемый
с водой растворитель выбирают из группы, содержащей этанол, изопропанол, метанол
45 или диметилсульфоксид.

9. Способ получения конъюгатов олигомера гиалуроновой кислоты с общими
формулами III и IV, определенными в п. 1, характеризующийся тем, что его проводят
как способ по любому из пп. 4-8, причем конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты-

диаминолинкера с общими формулами V и VI дополнительно приводят в реакцию по меньшей мере с одной альдегидной группой субстрата в присутствии восстанавливающего средства.

10. Способ получения по п. 9, характеризующийся тем, что восстанавливающее средство выбирают из группы, содержащей цианоборгидрид или пикولينборан.

11. Способ получения по п. 9 или 10, характеризующийся тем, что количество восстанавливающего средства находится в диапазоне от 0,1 до 5 эквивалентов, предпочтительно 3 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты.

12. Способ получения по любому из пп. 4-11, характеризующийся тем, что конъюгаты олигомера гиалуроновой кислоты-диаминолинкера с общими формулами V и VI получают таким образом, что олигомер гиалуроновой кислоты приводят в реакцию на его концевом аномерном центре в положении 1 с избытком диаминолинкера с общей формулой $H_2N-X-R^5-X-NH_2$, где R^5 выбирают из группы, содержащей C_1-C_{30} алкил, C_1-C_{30} алкиларил или C_1-C_{30} алкилгетероарил, необязательно содержащий один или несколько одинаковых или различных гетероатомов, выбранных из группы, содержащей N, O, S, а X представляет собой O или NH-группу; при pH в диапазоне от 3 до 6,99, после чего выделяют конъюгат олигомера гиалуроновой кислоты-диаминолинкера с общими формулами V и VI.

13. Способ получения по п. 12, характеризующийся тем, что реакцию проводят при pH в диапазоне от 3 до 6, предпочтительно в диапазоне от 5 до 6.

14. Способ получения по п. 12 или 13, характеризующийся тем, что реакцию проводят в присутствии карбоновой кислоты, выбранной из группы, содержащей уксусную кислоту, пропановую кислоту или молочную кислоту, предпочтительно уксусной кислоты.

15. Способ получения по п. 14, характеризующийся тем, что количество карбоновой кислоты находится в диапазоне от 5 до 30 эквивалентов, предпочтительно в диапазоне от 10 до 15 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты в качестве субстрата.

16. Способ получения по пп. 12-15, характеризующийся тем, что избыток линкера находится в диапазоне от 5 до 30 эквивалентов, предпочтительно 10 эквивалентов, относительно мольного количества дисахарида гиалуроновой кислоты в качестве субстрата.

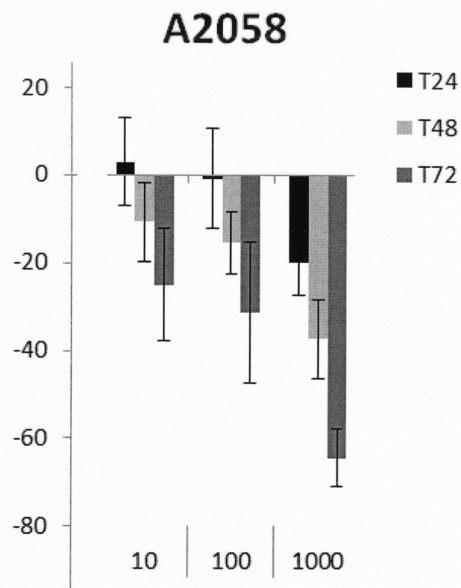
17. Способ получения по пп. 12-16, характеризующийся тем, что реакцию проводят при температуре от 10 до 40°C, предпочтительно при температуре 20°C, в течение 24-150 ч, предпочтительно 60-80 ч.

18. Конъюгат, определенный в пп. 1-3, в качестве носителя биологически активных олигомеров в фармацевтике и биомедицине.

19. Конъюгат, определенный в пп. 1-3, для применения в получении материалов с противораковым действием.

20. Конъюгат олигомера гиалуроновой кислоты, выбранный из: конъюгата октасахарида ГК (ГК-8) с дигидразидадипатом, конъюгата трисахарида ГК (ГК-3) с дигидразидадипатом, конъюгата октадека ГК (ГК-18) с дигидразидадипатом, конъюгата тетрасахарида ГК (ГК-4) с терефталойлдигидразидом.

1/1



Фиг. 1