



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 130 462** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>6</sup> **C 07 K 5/107, C 07 D 305/14, A 61 K 31/33, 47/30**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 94016158/04, 07.06.1993

(30) Приоритет: 19.06.1992 GB 9213077.2

(46) Дата публикации: 20.05.1999

(56) Ссылки: SU 094518 A, 1979. SU 166465 A, 1991. EP 0187547 A, 1986. EP 0393575 A, 1990. US 4097470 A, 1990. Корецек J. "Reactive copolymers of N-(2'-Hydroxypropyl) Methacrilamide with N-Methacrylated Derivatives of L-Leucine and L-Phenylalanine Macromol. Chem. 1977, v.178, p.2169 - 2183.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 17.02.94

(86) Заявка РСТ: EP 93/01433 (07.06.93)

(87) Публикация РСТ: WO 94/00156 (06.01.94)

(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул.Ильинка, 5/2, Союзпатент

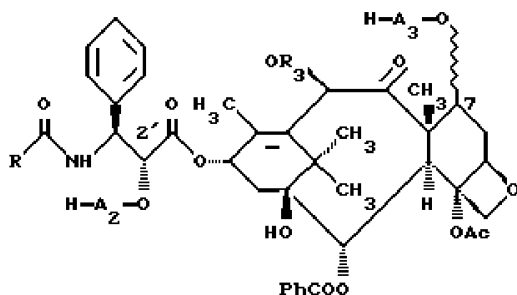
(71) Заявитель:  
Фармация энд Апджон С.п.А (IT)

(72) Изобретатель: Никола Монгелли (IT), Франческо Ангелуччи (IT), Энрико Пезенти (IT), Антонио Суарато (IT), Джованни Биазоли (IT)

(73) Патентообладатель:  
Фармация энд Апджон С.п.А (IT)

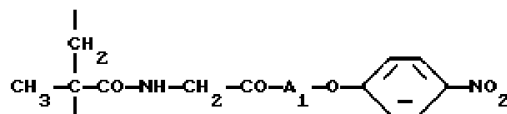
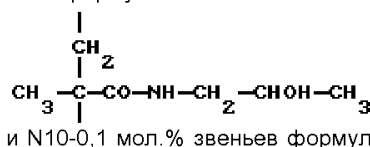
(54) **ПОЛИМЕРНЫЙ КОНЬЮГАТ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

(57) Реферат:  
Использование: в медицине. Сущность изобретения: полимерный конъюгат, получаемый путем взаимодействия соединений формулы II



где один из A<sub>2</sub> и A<sub>3</sub> означает химическую связь и другой означает А, R означает фенил или t - буюксигруппу, R<sub>3</sub> означает водород или ацетильную группу, А означает простую химическую связь, аминокислотный остаток или пептидный спейсер, выбранный из β-Ala, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly,

Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly, Phe, Gly-β-Ala, Phe-Gly-β-Ala, Phe-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Val-Ala-β-Ala, Phe-Ala-β-Ala, Leu-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Leu-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Tyr-Ala-β-Ala, Phe-Gly-Phe-β-Ala, Phe-Phe-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala или Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala, вводят во взаимодействие с активированным полимером, состоящим из 90-90,9 мол.% звеньев формулы



процесс ведут в безводном полярном растворителе при температуре от 15 до 40°C в течение от 1 до 24 ч в присутствии органического или неорганического основания

RU 2 130 462 C1

RU 2 130 462 C1

и затем обрабатывают конъюгат 2-гидроксипропиламином. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, включает в качестве действующего средства полимерный

конъюгат в эффективном количестве. Соединения характеризуются улучшенной растворимостью в воде и пониженной токсичностью по сравнению с паклитакселем. 4 с. и 3 з.п.ф-лы, 2 табл.

RU 2130462 C1

RU 2130462 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 130 462** <sup>(13)</sup> **C1**  
 (51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 07 K 5/107, C 07 D 305/14, A 61 K 31/33, 47/30**

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

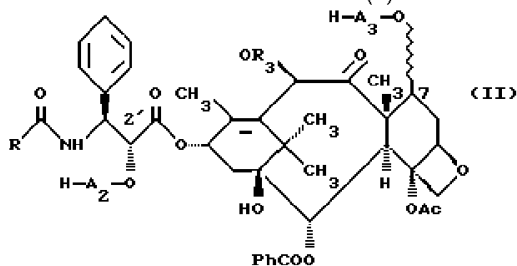
(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 94016158/04, 07.06.1993  
 (30) Priority: 19.06.1992 GB 9213077.2  
 (46) Date of publication: 20.05.1999  
 (85) Commencement of national phase: 17.02.94  
 (86) PCT application: EP 93/01433 (07.06.93)  
 (87) PCT publication: WO 94/00156 (06.01.94)  
 (98) Mail address: 103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, Sojuzpatent

(71) Applicant: Farmatsia ehnd Apdzhon S.p.A (IT)  
 (72) Inventor: Nikola Mongelli (IT), Franchesko Angeluchchi (IT), Ehnriko Pezenti (IT), Antonio Suarato (IT), Dzhovanni Biazoli (IT)  
 (73) Proprietor: Farmatsia ehnd Apdzhon S.p.A (IT)

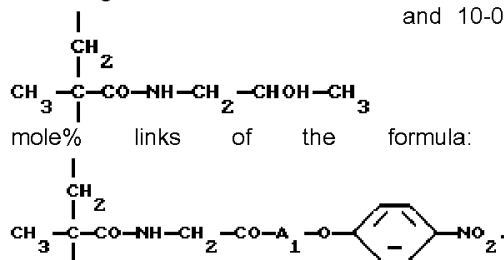
(54) **POLYMERIC CONJUGATE, A METHOD OF ITS SYNTHESIS AND A PHARMACEUTICAL COMPOSITION**

(57) Abstract:  
 FIELD: organic chemistry, polymers, peptides, medicine, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to a polymeric conjugate synthesized by interaction of compounds of the formula (II):



where one of A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> means chemical bond and other means A; R means phenyl or t-butoxy-group; R<sub>3</sub> means hydrogen atom or acetyl-group; A means a simple chemical bond, an amino acid residue or peptide spacer taken from: β-Ala, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-β-Ala, Phe-Gly-β-Ala, Phe-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Val-Ala-β-Ala,

Phe-Ala-β-Ala, Leu-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Leu-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Tyr-Ala-β-Ala, Phe-Gly-Phe-β-Ala, Phe-Phe-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala or Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala which are interacted with an activated polymer consisting of 90-90.9 mole% links of the formula: and 10-0.1



. Process is carried out in an anhydrous polar solvent at 15-40 C for 1-24 h in the presence of an organic or inorganic base followed by treatment of obtained conjugate with 2-hydroxypropylamine. Invention relates to a pharmaceutical composition showing an antitumor activity and containing a polymeric conjugate as an active component taken at effective amount. EFFECT: improved solubility, decreased toxicity of synthesized compounds as compared with that of paclitaxel. 7 cl, 2 tbl

RU 2 130 462 C1

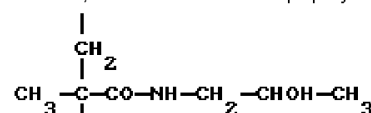
RU 2 130 462 C1

Изобретение направлено на связанный с полимером паклитаксель и связанные с полимером производные паклитакселя, обладающие противоопухолевой активностью, на способ их получения и на содержащие их фармацевтические препараты.

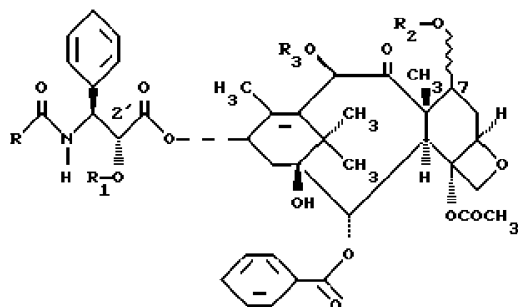
Паклитаксель (в некоторых публикациях называемый также таксоллом) принадлежит к таксановому семейству дитерпенов, и был выделен с последующей характеристикой из экстракта коры *Taxus brevifolia* L. Известны также и аналоги паклитакселя, полученные на основе 10-дезацетибаккатина III, экстрагированного из игл *Taxus baccata* L. (см. Wain и др., IACS, 93, 2325 (1971); Lovelle и др., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 31 (1990)). Эти соединения, как показано, обладают ярко выраженной противоопухолевой активностью, но в то же время плохо растворимы в воде, и их введение инъектированием или внутривенным вливанием при использовании в качестве носителя кремофора EL (фирменное название) сопровождается некоторыми токсичными побочными эффектами.

Настоящим изобретением дается полимерный конъюгат формулы I состоящий по существу из:

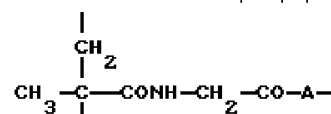
90 - 99,9% мол. звеньев формулы



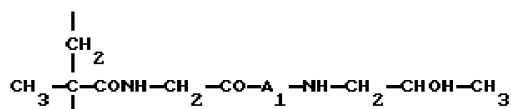
0,1 - 5% мол. звеньев формулы:



в которой один из R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> представляет собой остаток сополимера формулы



а другой представляет атом водорода; 0-9,9% мол. звеньев формулы:



где R представляет фенил или трет-бутоксигруппу, R<sub>3</sub> представляет водород или ацетил, A и A<sub>1</sub>, которые могут быть одинаковыми или различными, представляют простую химическую связь, аминокислотный остаток или пептидный спейсер, выбранный из β-Ala, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-β-Ala,

Phe-Gly-β-Ala, Phe-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Val-Ala-β-Ala, Phe-Ala-β-Ala, Leu-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Phe-Leu-β-Ala, Leu-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Tyr-Ala-β-Ala, Phe-Gly-Phe-β-Ala, Phe-Phe-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala или Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala.

Если более конкретно, то настоящим изобретением даются полимерные конъюгаты паклитакселя и производных паклитакселя с улучшенной растворимостью в воде и пониженной токсичностью.

Рекомендуется, чтобы мол. % звеньев, содержащих паклитаксель и производные паклитакселя, составлял 0,5-2, более предпочтительно, если содержание паклитакселя в полимере составляет 2-10% (мас./мас.), и к наиболее предпочтительным относятся те соединения, в которых содержание паклитакселя составляет 4-7% (мас./мас.). Волнистая линия в формуле означает, что кислород, присоединенный в 7-положении формулы паклитакселя, может находиться в обеих конфигурациях, т.е. иметь β-(природный) или α-конфигурацию.

Рекомендуется, чтобы R представлял фенил, R<sub>3</sub>-ацетил, и A остаток Phe-Leu-Gly или Phe-Leu-Gly-β-Ala. Все аминокислотные остатки характеризуются природной 1-конфигурацией. Согласно рекомендуемому воплощению изобретения полимерный конъюгат является сополимером 1-метакрил-иламино-2-гидроксипропана, (метакрилоилглицил-фенилаланил-лейцилглицил)-3-амино-2-гидроксипропана и 2-(метакрилоил)-глицилфенилаланил-лейцилглицил-β-аланилпаклитакселя.

Содержание в % мас./мас. определяют после ферментативного гидролиза с помощью ВЭЖХ по методике, аналогичной методике, приведенной в работе Cancer Treatment Rep. 71, 53-59 (1987).

Ферментативный анализ.

К 1 мл мышинной или человеческой плазмы добавляют в различных концентрациях связанный с полимером паклитаксель и в определенное время (24, 48, 72, 96 ч) отбирают по 100 мкл и хранят при -70 °С до дополнительной обработки.

Методика экстрагирования.

Образцы экстрагируют добавлением 75 мкл 0,5 М тетрабутиламмофосфата (ТБАФ), 1250 мкл CH<sub>3</sub>CN и 150 мкл 5 М NaCl и интенсивным встряхиванием 20' при 4 °С.

По окончании указанного периода образцы центрифугируют 10' при 15000•g, надосадочную жидкость собирают и испаряют в высоковакуумной центрифуге. Образцы восстанавливают добавлением 500 мкл смеси MeOH-вода (75:25 об./об.) и инъектируют в ВЭЖХ колонку для определения полного содержания паклитакселя (в %).

ВЭЖХ система.

Колонка - Нова-Пак C<sub>18</sub> (Уотерс) 3,9 • 300 мм.

Скорость потока - 1,5 мл/мин.

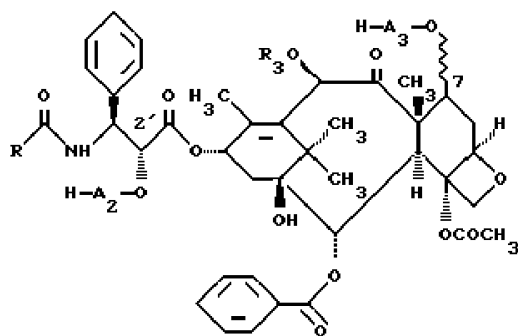
Детектор - УФ, 231 нм.

Инъектирование - 20 мкл.

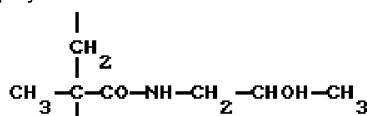
Подвижная фаза - 57,5% H<sub>2</sub>O с pH 2+42,5% CH<sub>3</sub>CN.

Настоящим изобретением, кроме того, дается способ получения полимерного конъюгата, состоящий в реакции соединения

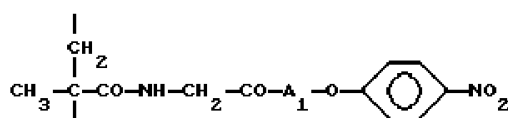
формулы II



в которой один из  $A_2$  и  $A_3$  представляет химическую связь, а другой представляет А, где А, R и  $R_3$  принимают вышеуказанные значения, с активированным полимером, состоящим на 90-99,9 мол.% из звеньев формулы



и на 10-0,1 мол.% из звеньев формулы



где  $A_1$  принимает вышеуказанные значения,

с последующей обработкой полученного полимерного конъюгата 2-гидроксипропиламином.

Реакцию соединений формулы II с активированным полимером рекомендуется проводить в безводном полярном органическом растворителе, таком как диметилсульфоксид или диметилформамид, возможно в присутствии органического или неорганического основания, такого как щелочной карбонат, диметиламинопиридин или триэтиламин. Реакция обычно продолжается 1-24 часа.

Реакцию обычно проводят при температуре 15-40°C, предпочтительно при комнатной температуре. Примеры щелочного карбоната включают карбонаты щелочных металлов и карбонаты щелочноземельных металлов.

Некоторые из исходных соединений формулы II являются известными соединениями, например: паклитаксель или аналоги паклитакселя, или же могут быть получены на основе известных соединений.

К примеру, 7-эпи-производные могут быть получены кипячением в толуоле паклитакселя или его аналогов в присутствии основания ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  или диазабисциклоундецен).

Другие соединения формулы II являются новыми соединениями, в частности, те соединения, в которых  $A_3$  представляет остаток  $\beta$ -Ala, и те соединения, в которых либо  $A_2$ , либо  $A_3$  представляет ди-, три-, или тетрапептидный спейсер согласно вышеприведенному определению А, и такие соединения охватываются объемом изобретения.

Соединения формулы II, в которых  $A_2$  отличен от простой химической связи,

могут быть получены реакцией паклитакселя или аналога паклитакселя с защищенной аминокислотой или пептидом в присутствии конденсирующего средства, а также в присутствии или отсутствии катализатора, предпочтительно при комнатной температуре с последующим удалением по известным методикам защитной группы.

Конденсация может быть также осуществлена использованием активных эфиров, например, п-нитрофенилового эфира пептида или аминокислоты. Приемлемые конденсирующие средства включают карбодимиды, например, дициклогексил-карбодимид (ДЦК).

Приемлемые катализаторы включают: 4-диметиламинопиридин, (ДМАП), пиридин или триэтиламин.

Для защиты аминогруппы могут быть применены различные известные защитные группы, и в качестве исходных соединений могут быть использованы продажные защищенные пептиды или аминокислоты. Могут быть использованы аминокислоты или пептиды, защищенные трет-ВОС, тритилом, ФМОК или карбобензилоксигруппой (CBZ). Рекомендуются аминокислоты или пептиды, защищенные трет-ВОС, тритилом и ФМОК.

Соединения формулы II, в которых  $A_3$  отличен от простой химической связи, могут быть получены защитой или блокированием 2-гидроксигруппы, затем этерифицированием гидроксила в 7-положении с последующим удалением защитной или блокирующей группы 2-положении.

Соединения формулы II, в которых  $A_3$  представляет остаток Gly или  $\beta$ -Ala, более предпочтительно получать реакцией паклитакселя с 2-3 эквивалентами N-защищенной аминокислоты с образованием 2,7-дизамещенного паклитакселя, отщеплением аминокислоты в 2-положении и затем деблокированием аминокислоты в 7-положении.

Реакцию паклитакселя с защищенной аминокислотой проводят в присутствии конденсирующего средства и катализатора, аналогичных вышеуказанным.

Отщепление 2-аминокислоты осуществляют установлением pH 7-7,4 в растворе 2,7-ди(аминокислоты)паклитакселя, например, смешиванием 2,7-ди(аминокислоты)паклитакселя с фосфатным буфером (pH 7-7,4) или небольшим избытком  $\text{NaHCO}_3$ .

Деблокирование аминокислоты проводят по известным методикам деблокирования аминокислот, например, обработкой слабой кислотой, такой как уксусная кислота или восстановлением.

Так, например, паклитаксель оставляет реагировать с 2-3 мол. эквивалентами N-защищенной аминокислотой (трет-ВОС, СВ или ФМОК защищенной) в хлористом метиле в присутствии ДЦК и каталитического количества

4-диметиламинопиридина. Таким путем в 2 и 7-положения вводят защищенную аминокислоту. 2,7-Бисаминокислотное производное паклитакселя оставляет на 2-5 часов в присутствии  $\text{NaHCO}_3$  в смеси  $\text{H}_2\text{O}$ -МЕОН, в результате чего происходит селективное деблокирование 2-положения с образованием 7-замещенного производного

паклитакселя. Защитные группы удаляют с помощью приемлемых деблокирующих агентов (например: кислоты, мягкого основания или гидрогенолизом).

Активированный полимер представляет собой синтетический водорастворимый полимер, полученный монополимеризацией N'(2-гидроксипропил)метакриламида с п-нитрофениловыми эфирами N-метакрилоилполипептидов согласно патентам США 4062831 и 4097470.

Полимерные конъюгаты формулы I и новые производные паклитакселя формулы II отличаются хорошей растворимостью в воде, биосовместимостью и выделяют паклитаксель или производное паклитакселя в плазму или после попадания вовнутрь в клетки путем отщепления олигопептидных спейсеров.

Биологическая активность.

Анализ на соединение и разъединение микротрубочек.

Тубулин мозга теленка получают в двух циклах соединения-разъединения (Ihelanski M. L., Caskin F., Cantor C.R., RrOC. hatl. Acad. S ci. США 70, 7665-768, 1973) и хранят в жидком азоте в MAB (0,1 M MES, 2,5 mM EGTA, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, pH 6,4).

Все опыты проводят на белке, хранившимся менее 4 недель.

Перед каждым опытом тубулин выдерживают 30 мин при 4°C.

Ансамбли регистрируют по методике Caskin и др. (Caskin F., Cantor C.R., Ihelanski M. L.Y. Molec. Biol. 89, 737-758, 1874). Кювету (толщиной 1 см) с тубулином (1 мг/мл) и 1 mM ГТФ нагревают до 37°C и при 340 на двухволновом двухлучевом спектрофотометре Перкин-Эльмер 557, снабженным самописцем и термостатически регулируемой камерой для образца, непрерывно проводят определение мутности.

Через 30 мин добавляют 4 mM CaCl<sub>2</sub> и в течение 10 мин по уменьшению мутности определяют деполимеризацию. Через регулярные промежутки времени в 15 мин добавляют определенные дозы испытуемых соединений и регистрируют изменение мутности. Данные выражают в виде процента повторной полимеризации, вызываемой испытуемым соединением. Получение результаты приведены в таблице 1.

In vitro анализ чувствительности и лекарственному средству

Экспоненциально растущими клетками мышины мелономы B16-F10 засевают ( $2 \cdot 10^4$  клеток/мл) в RPM1 среде с добавкой 10% дезактивированной нагреванием околплодной телячьей сыворотки и 2 mM глутамина в планшеты с 24 ячейками (Костар). Сразу же после посева добавляют в определенных концентрациях испытуемое соединение. Ингибирование роста клеток определяют подсчетом числа клеток с помощью разделяющего счетчика после инкубирования в течение 72 часов. Для каждого испытуемого соединения используют культуры с тремя концентрациями соединения. Антипролиферирующую активность испытуемых соединений подсчитывают по кривым зависимости реакции от дозы и выражают как ИК<sub>50</sub> (доза, вызывающая 50%-ное ингибирование роста

клеток в обработанных культурах в сравнении с необработанными контрольными культурами). Полученные результаты приведены в табл. 1 (см. в конце описания).

Испытание сополимер-паклитакселя, полученного в примере 6 in vivo против B16-P10 мышины мелономы в сравнении с паклитакселем.

Мыши.

Самки мышей линии C57B16 получены с фермы Чарльз Ривер, Италия.

В начале опытов возраст животных 8-10 недель.

Лекарственные средства.

Из-за ограниченной растворимости паклитакселя в воде его растворяют в носителе, состоящим из 50% полиоксиэтилированного касторового масла (кремофор EL) и 50% этанола, с последующим разбавлением 5%-тным раствором глюкозы до целевой концентрации. Раствор несколько мутноват и спустя небольшой промежуток времени наблюдается образование осадка.

Соединение примера 6 легко растворяется в 5%-ом растворе глюкозы, и полученный раствор остается прозрачным длительное время (более 2 часов). Конечные концентрации относятся к содержанию паклитакселя в соединении (в общей сложности 4%).

Опухоль

Используют мышиную мелоному B16-P10.

Суспензию  $10^5$  клеток опухоли в 0,2 мл инъецируют подкожно в бок мыши.

Циркулем измеряют размер опухоли, массу опухоли подсчитывают по формуле

$$\frac{a^2 + b^2}{2}$$

Введение лекарственного средства.

Паклитаксель вводят внутрибрюшинно, вследствие его плохой растворимости и токсичности носителя.

Соединение примера 6 вводят внутривенно. Оба соединения вводят на 1, 5 и 9 день после имплантации опухоли.

Приведенные в табл. 2 данные показывают большую активность соединения настоящего изобретения по сравнению с паклитакселем (см. в конце описания).

Доза полимерного конъюгата относится к содержанию паклитакселя.

Определение токс. (токс. - число мышей, погибших в начале отравления) проводят, если мышь погибает раньше контрольной или если наблюдаются заметные потери в массе тела и/или уменьшение размера селезенки и/или печени. Из приведенных данных видно, что полимерные конъюгаты настоящего изобретения обладают прекрасной противоопухолевой активностью. Таким образом, эти соединения являются полезными противоопухолевыми средствами вследствие их низкой токсичности и повышенной растворимости в воде по сравнению с паклитакселем и его аналогами. Примеры опухолей, подлежащих лечению, включают: саркомы, карциному, лимфомы, нейробластому, меланому, опухоль Вильса, лейкозы и аденкарциному.

Улучшенная растворимость и пониженная токсичность полимерных конъюгатов настоящего изобретения означает их пригодность для внутривенных инъекций или

вливаний. Дозировка зависит от возраста, массы и состояния больного. Дозировки могут находиться в интервале от 1 мг/кг массы тела до 1 г/кг массы тела, предпочтительно 4 - 800 мг/кг массы тела. Обычные составы содержат связанный с полимером паклитаксель/производное паклитакселя в количестве, эквивалентном 0,5; 1,5; 10; 20; 25 или 50 мг активного паклитакселя/производного паклитакселя.

Полимерные конъюгаты могут быть приготовлены в виде фармацевтических препаратов с фармацевтическими приемлемыми носителями или разбавителями. Может быть использован любой подходящий носитель или разбавитель. Растворы для внутривенных инъекций или вливаний могут содержать в качестве носителя или разбавителя, например, стерильную воду, или что предпочтительнее, они могут иметь вид стерильных водных или изотонических солевых растворов.

Нижеследующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1. Сополимер 1-метакрилоиламино-2-гидроксипропана, 1-(метакрилоил-глицил-фенилаланил-лейцил-глицил)амино-2-гидроксипропана и 2'-(метакрилоил-глицил-фенилаланил-лейцил-глицил)паклитакселя.

К раствору 1,4 г сополимера 1-метакрилоиламино-2-гидроксипропана и N-(метилкарбонил-Phe-Leu-Gly-4-нитрофенокси) метакриламида, полученного по методике 1. Коресек и др. (Makzomol Chem. 177, 2833 (1976)), 15 мл безводного диметилформамида добавляют 100 мг паклитакселя и 15 мг диметиламинопиридина.

Желтый раствор перемешивают 8 часов в безводных условиях при комнатной температуре. Затем в реакционную колбу по каплям прибавляют 0,2 мл 2-гидроксипропиламин и содержимое колбы перемешивают 30 минут.

Реакционную смесь нейтрализуют 0,3 мл ледяной уксусной кислотой, концентрируют в вакууме до небольшого объема и затем переносят в 200 мл ацетона

После перемешивания 30 минут осадок отфильтровывают и промывают ацетоном с получением 1,25 г заглавного соединения.

Содержание паклитакселя составляет 4,5% (установлено ферментативным гидролизом и ВЭЖХ анализом).

Из раствора ацетона выделяют непрореагированный паклитаксель.

Пример 2.

2'-(N-Тритил-фенилаланил-лейцил-глицил)паклитаксель.

К раствору 170 мг паклитакселя в 16 мл ацетонитрила добавляют 24 мг диметиламинопиридина и 150 N-тримил-фенилаланил-лейцил-глицина-4-нитрофенилового эфира.

Желтый раствор перемешивают 20 часов при комнатной температуре, после чего испаряют досуха в вакууме. Остаток хроматируют на силикагеле с применением в качестве элюента смеси этилацетат-гексан (35 : 25) и получением 380 мг заглавного соединения.

$^1\text{H-NMR}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0,82 (д, J = 6,4 Гц, 3H,  $\delta$  - Leu), 0,85 (д, J = 6,7 Гц, 3H,  $\delta$  - Leu), 1,15 (с, 3H, 16), 1,26 (с, 3H,

17), 1,2 - 1,6 (м, 3H,  $\beta+\beta+\gamma$ - Leu), 1,69 (с, 3H, 19), 1,85 (с, 1H, OH-1), 1,89 (м, 1H, 6  $\beta$  ), 1,96 (д, J = 1,2 Гц, 3H, 18), 2,14 (дв. д, J = 5,9 Гц, J = 13,5 Гц, 1H,  $\beta$  - Phe), 2,24 (с, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}/10$ ), 2,2 - 2,7 (м, 5H,  $\text{CH}_3$ -14 + OH-7 +  $6\alpha+\beta$  - Phe + NH-Phe), 2,47 (с, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -4), 3,5 (м, 1H,  $\alpha$ - Phe), 3,74 (дв. д, J = 4,7 Гц, J = 18,2 Гц, 1H,  $\alpha$ - Gly), 3,8 (м, 1H,  $\alpha$ - Leu), 3,83 (д, J = 7 Гц, 1H, 3), 4,17 (дв. д, J = 7 Гц, J = 18,2 Гц, 1H,  $\alpha$ - Gly), 4,22, 4,33 (два д, J = 8,5 Гц, 2H,  $\text{CH}_2$ -20), 4,46 (м, 1H, 7), 4,97 (дв. д, J = 2,2 Гц, J = 9,9 Гц, 1H, 5), 5,44 (д, J = 2,3 Гц, 1H, 2'), 5,71 (д, J = 7 Гц, 1H, 2), 5,97 (дв. д, J = 4,7 Гц, J = 7 Гц, 1H, NH-Gly), 6,07 (дв. д, J = 2,3 Гц, J = 9,4 Гц, 1H, 3'), 6,2 - 6,3 (м, 2H, 13 + 10), 6,8 - 9,2 (м, 30H, 6-Ph), 6,95 (д, J = 6,7 Гц, 1H, NH-Leu), 8 (д, J = 9,4 Гц, 1H, NH-4').

Пример 3.

2'-(Фенилаланил-лейцил-глицил)паклитаксель

В смеси ледяной уксусной кислоты (22 мл) и воды (6 мл) растворяют 2'-(N-Trit-Phe-Leu-Gly)паклитаксель (250 мг) и раствор перемешивают 1 час при комнатной температуре.

Растворитель испаряют досуха в вакууме, остаток перемешивают 30 минут в смеси диэтиловый эфир - гексан (1 : 1) и после фильтрования получают 160 мг заглавного соединения.

ББА-МС:  $m/z$  1171/M + H<sup>+</sup>, 1112 M-CH<sub>3</sub>COOH + 2H, 1051, 1024, 911, 603, 596, 509.

$^1\text{H-NMR}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0,88 (д, J = 6,4 Гц, 3H,  $\delta$ - Leu), 0,92 (д, J = 6,4 Гц, 3H,  $\delta'$ - Leu), 1,13 (с, 3H, 16), 1,16 (с, 3H, 17), 1,4 - 2 (м, 4H,  $\beta+\beta+\gamma$ + Leu + 6  $\beta$  ), 1,69 (с, 3H, 19), 1,91 (д, J = 1,2 Гц, 3H, 18), 2,16 (дв. д, J = 6 Гц, J = 13,8 Гц, 1H, 14), 2,23 (с, 3H,  $\text{COCH}_3$ -10), 2,4 - 2,6 (м, 3H, 6  $\alpha$  + 14  $\beta$  - Phe), 2,53 (с, 3H,  $\text{COCH}_3$ -4), 2,9 (дв. д, J = 4,1 Гц, J = 13,5 Гц, 1H,  $\beta'$ - Phe), 3,49 (дв. д, J = 4,1 Гц, J = 9,1 Гц, 1H,  $\alpha$ - Phe), 3,82 (д, J = 7,3 Гц, 1H, 3), 3,9 - 4,1 (м, 2H,  $\alpha+\alpha'$ - Gly), 4,22, 4,33 (два д, J = 8,7 Гц, 2H,  $\text{CH}_2$ -20), 4,27 (м, 1H,  $\alpha$ - Leu), 4,44 (дв. д, J = 6,4 Гц, J = 10,8 Гц, 7), 4,98 (дв. д, J = 2,4 Гц, J = 9,7 Гц, 5), 5,61 (д, J = 3,2 Гц, 1H, 2'), 5,7 (д, J = 7,3 Гц, 1H, 2), 6,12 (дв. д, J = 3,2 Гц, J = 9,4 Гц, 1H, 3'), 6,21 (м, 2H, 13), 6,28 (с, 1H, 10), 6,8 - 8,2 (м, 21H, 4-Ph + NH Leu), 7,87 (д, J = 9,4 Гц, 1H, NH-4').

Пример 4.

Сополимер

1-метакрилоиламино-2-гидроксипропана, 1-(метакрилоил-глицил)амино-2-гидроксипропана и

2'-(метакрилоил-глицил-фенилаланил-лейцил-глицил)паклитакселя.

К раствору 1 г сополимера 1-метакрилоиламино-2-гидроксипропана и N-(метилкарбони-4-нитрофенокси)метакриламида, полученного по методике P. Rejmanova и др. (Makromol. Chem. 178, 2159 - 2168), в 10 мл безводного диметилформамида добавляют 100 мг 2'-Phe-Leu-Gly-паклитакселя и 10 мг диметиламинопиридина.

Желтый раствор перемешивают 2 часа в безводных условиях при комнатной

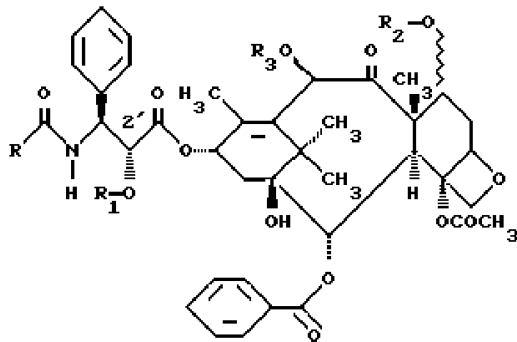
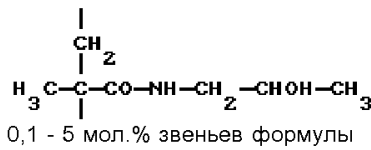


заглавного соединения.

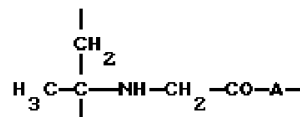
Содержание паклитакселя составляет 7,8% мас./мас.

### Формула изобретения:

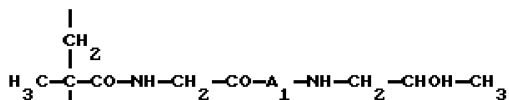
1. Полимерный конъюгат, состоящий по существу из 90 - 99,9% звеньев формулы



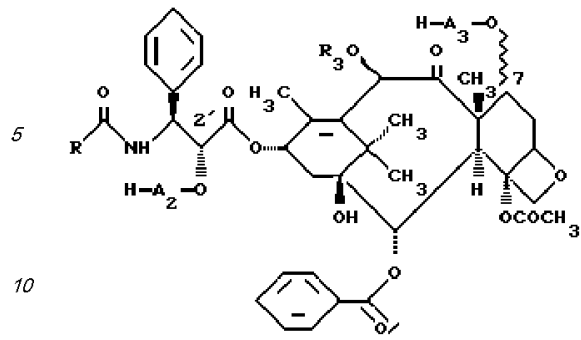
в которой один из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляет остаток сополимера формулы



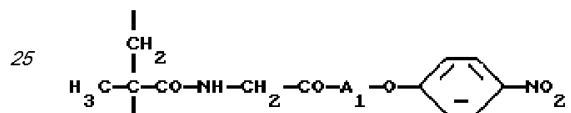
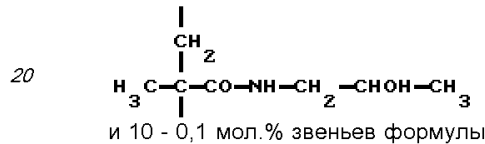
а другой - атом водорода, не более 9,9 мол.% звеньев формулы



где R представляет фенил или трет-бутоксигруппу;  
R<sub>3</sub> представляет водород или ацетил;  
A и A<sub>1</sub>, которые могут быть одинаковыми или различными, представляют простую химическую связь, аминокислотный остаток или пептидный спейсер, выбранный из: β-Ala, Gly, Phe-Gly, Phe-Phe, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, Gly-β-Ala, Phe-Gly-β-Ala, Phe-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Val-Ala-β-Ala, Phe-Ala-β-Ala, Leu-Phe-β-Ala, Leu-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Phe-Leu-β-Ala, Leu-Leu-Gly-β-Ala, Phe-Tyr-Ala-β-Ala, Phe-Gly-Phe-β-Ala, Phe-Phe-Gly-β-Ala, Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala, или Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-β-Ala, полученный путем взаимодействия соединения формулы II



где один из A<sub>2</sub> и A<sub>3</sub> означает химическую связь и другой означает A;  
значения R, R<sub>3</sub> и A указаны выше,  
с активированным полимером, состоящим по существу из 90 - 99,9 мол.% звеньев формулы

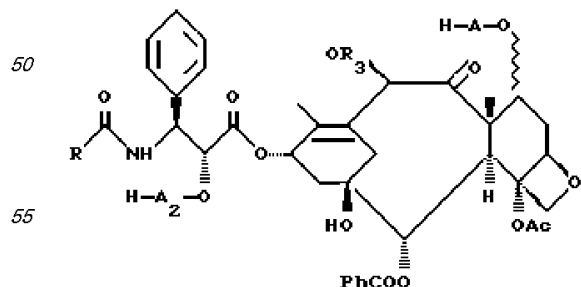


с последующей обработкой полученного конъюгата, который содержит от 2,65 до 7,8 мас. % звена, образованного из активного соединения формулы II, 2-гидроксипропиламином, причем процесс проводят в безводном полярном растворителе при температуре 15 - 40°C в течение 1 - 24 ч в присутствии органического или неорганического основания.

2. Конъюгат по п.1, в котором R - фенил, R<sub>3</sub> - ацетил, A - Phe-Leu-Gly или Phe-Leu-Gly-β-Ala.

3. Конъюгат по п.1 или 2, являющийся сополимером 1-метакрилоиламино-2-гидроксипропана, (метакрилоилглицил-фенилаланил-лейцил-глицил)-3-амино-2-гидроксипропана и 2'-(метакрилоилглицил-фенилаланил-лейцил-глицил-β-аланил)паклитакселя.

4. Способ получения полимерного конъюгата по п.1, заключающийся в том, что соединения формулы II



где один из A<sub>2</sub> и A<sub>3</sub> представляет химическую связь, а другой представляет A, где A, R и R<sub>3</sub> принимают значения по п.1, вводят во взаимодействие с активированным полимером как определено в п. 1, причем реакцию проводят в безводном полярном растворителе при температуре 15 - 40°C в течение 1 - 24 ч в присутствии органического или неорганического основания

и затем обрабатывают полученный конъюгат 2-гидроксипропиламином.

5. Соединение формулы II по п.1, в которых R - фенил, R<sub>3</sub> - ацетил, A<sub>2</sub> = Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Leu-Gly или Phe-Leu-Gly-β-Ala, A<sub>2</sub> - химическая связь.

6. Соединения формулы II по п.1, в которых R - фенил, R<sub>3</sub> - ацетил, A<sub>2</sub> - химическая связь, A<sub>3</sub>-β-Ala или

Phe-Leu-Gly-β-Ala.

7. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, включающая действующее средство и разбавитель или носитель, отличающаяся тем, что в качестве действующего средства она содержит соединение по пп.1, 2 или 3 в эффективном количестве.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2130462 C1

RU 2130462 C1

Таблица 1

| Соединение, полученное в               | Соединение тубулина |       | ИК <sub>50</sub> (мкМ) |
|--|---------------------|-------|------------------------|
|  | 0,5 мкМ             | 5 мкМ |                        |
| Примере 1                              | 0                   | 15    | 19                     |
| Примере 9                              | 78                  | 145   | 47                     |
| Примере 3                              | 46                  | 86    | 23                     |
| Примере 4                              | 0                   | 10    | 11                     |
| Примере 6                              | 0                   | 10    | 51                     |
| Ссылочное соединение<br>- Паклитаксель | 41                  | 96    | 39                     |

Таблица 2

| Соединение       | Доза (мг/кг) | Ингибирование опухоли (%) | Токс. |
|------------------|--------------|---------------------------|-------|
| Контроль         | -            | -                         | -     |
| Паклитаксель     | 14,6         | 53                        | 0/10  |
|                  | 22           | 38                        | 0/10  |
|                  | 33           | 92                        | 1/7   |
| Соединение пр. 6 | 14,6         | 77                        | 0/9   |
|                  | 22           | 79                        | 0/10  |

RU 2130462 C1

RU 2130462 C1