



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005110059/04, 04.09.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.09.2003

(30) Конвенционный приоритет:
06.09.2002 US 60/408,855

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2005

(45) Опубликовано: 27.08.2008 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 91/13100 A, 05.09.1991. WO 00/01734
A, 13.01.2000. RU 95112573 C1, 20.02.1997. RU
2136698 C1, 10.09.1999. RU 2097027 C1,
27.11.1997.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
06.04.2005

(86) Заявка РСТ:
US 03/27588 (04.09.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 2004/022099 (18.03.2004)

Адрес для переписки:
119034, Москва, Пречистенский пер., 14,
стр.1, 4 этаж, "Гоулингз Интернэшнл Инк.",
В.Н.Дементьеву

(72) Автор(ы):

ЧЕНГ Джианджан (US),
ДЭВИС Марк Е. (US),
КХИН Кэй Т. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИНСЕРТ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(54) ПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к циклодекстринсодержащим полимерным соединениям, являющимся носителями для доставки терапевтических средств, и фармацевтическим препаратам на их основе. Изобретение также относится к способу лечения субъектов введением терапевтически эффективного количества предложенного циклодекстринсодержащего полимерного

соединения.

Предложенные циклодекстринсодержащие полимеры улучшают стабильность лекарства, повышают его растворимость, а также снижают токсичность терапевтических средств при применении in vivo. Кроме того, путем выбора различных линкерных групп и целевых лигандов этих полимеров можно осуществлять регулирующую доставку терапевтических агентов. 7 н. и 49 з.п. ф-лы, 13 ил., 7 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C08B 37/16 (2006.01)**A61K 47/40** (2006.01)**A61K 47/30** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005110059/04, 04.09.2003**(24) Effective date for property rights: **04.09.2003**(30) Priority:
06.09.2002 US 60/408,855(43) Application published: **10.10.2005**(45) Date of publication: **27.08.2008 Bull. 24**(85) Commencement of national phase: **06.04.2005**(86) PCT application:
US 03/27588 (04.09.2003)(87) PCT publication:
WO 2004/022099 (18.03.2004)Mail address:
**119034, Moskva, Prechistsenskij per., 14,
str.1, 4 ehtazh, "Goulingz Internehshnl
Ink.", V.N.Dement'evu**

(72) Inventor(s):

**ChENG Dzhiandzhan (US),
DEhVIS Mark E. (US),
KKhIN Kehj T. (US)**

(73) Proprietor(s):

INSERT TERAP'JuTIKS, INK. (US)(54) **CYCLODEXTRENE-BASED POLYMERS FOR THERAPEUTICS DELIVERY**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to cyclodextrin-containing polymeric compounds, which are carriers for delivery of therapeutics, and pharmaceutical preparations based on them. Invention also relates to method of treating subjects with therapeutically effective quantity of said cyclodextrin-containing polymeric compound. Claimed cyclodextrin-containing polymers improve medication stability, increase

its solubility and reduce toxicity of therapeutics when used in vivo. Furthermore, by selecting from a variety of linker groups and targeting ligands of said polymers it is possible to realise controlled delivery of therapeutic agents.

EFFECT: obtaining cyclodextrin-containing polymer compounds, improving medication stability, increasing its solubility and reducing toxicity of therapeutics when used in vivo.

56 cl, 13 dwg, 7 tbl, 46 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Предпосылки создания изобретения

Доставка некоторых терапевтических агентов, имеющих маленькие молекулы, таких как камптотецин, вызывает проблемы вследствие их неэффективных фармакологических профилей. Эти терапевтические агенты часто имеют низкую растворимость в воде, их биоактивные формы существуют в равновесии с неактивной формой, или же высокие системные концентрации этих агентов приводят к токсичным побочным эффектам. Некоторые подходы к решению проблемы их доставки в организм состояли в присоединении агента непосредственно к водорастворимому полимеру, такому как гидроксипропил-метакрилат (HPMA), полиэтиленгликоль и поли-L-глутаминовая кислота. В некоторых случаях такие конъюгаты пригодились для солюбилизации или стабилизации биоактивной формы терапевтического агента или получения состава с пролонгированным высвобождением, который позволил преодолеть трудности, связанные с высокими системными концентрациями агента.

Другой подход к проблеме доставки лекарств состоял в образовании комплексов включения «хозяин/гость» между терапевтическим агентом и циклодекстринами или их производными. Циклодекстрины (α , β и γ) и их окисленные формы обладают уникальными физико-химическими свойствами, такими как хорошая растворимость в воде, низкая токсичность и низкий иммунный ответ. В настоящее время большинство исследований в области доставки лекарств сфокусировано на их способности образовывать супермолекулярные комплексы, в которых циклодекстрины образуют комплексы включения хозяин/гость с молекулами терапевтических агентов и тем самым изменяют физические, химические и/или биологические свойства молекул «гостей».

В патенте США 5 276 088 описан способ синтеза полимеров, содержащих циклодекстрин, путём взаимодействия поливинилового спирта или целлюлозы или её производных с производными циклодекстрина или путём сополимеризации производного циклодекстрина с винилацетатом или метилметакрилатом.

В патенте США 5 855 900 описан биоразлагающийся полимер, содержащий циклодекстрин. В этом патенте описано супермолекулярное-структурированное биоразлагающееся полимерное соединение, содержащее множество модифицированных

лекарством α , β , γ -циклодекстринов и линейную полимерную цепь, простирающуюся через структурную полость циклодекстринов.

Всё ещё существует необходимость в разработке новых подходов к доставке
5 маленьких терапевтических агентов, имеющих неэффективные фармакологические профили, таких как камптотецин, паклитаксел, доксорубицин и циклоспорин А.

10 Сущность изобретения

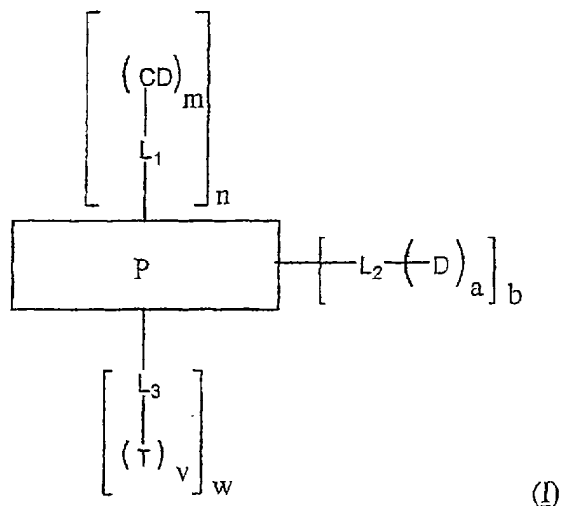
Данное изобретение относится к новым композициям полимерных конъюгатов, определяемых как полимерные материалы, ковалентно соединённые с
15 терапевтическими/биоактивными агентами в качестве носителей для доставки терапевтических агентов. Согласно одному аспекту данное изобретение предусматривает водорастворимый биосовместимый полимер, ковалентно присоединённый к биоактивным соединениям при помощи фрагментов, которые расщепляются в биологической среде,
20 высвобождая биоактивные соединения. В некоторых таких вариантах полимер включает циклические фрагменты, чередующиеся с молекулами линкера, которые соединяют циклические структуры, например, в линейные или разветвлённые полимеры,
25 предпочтительно, линейные полимеры. Этот полимер может быть поликатионным, полианионным или неионным. Биоактивный агент, который может быть терапевтическим, диагностическим или адъювантом, предпочтительно, составляет, по
30 меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или даже 35% от веса конъюгата. В некоторых вариантах скорость высвобождения лекарства зависит, в основном, от скорости гидролиза. В некоторых других вариантах скорость высвобождения лекарства
35 зависит, в основном, от ферментативного расщепления.

Настоящее изобретение предусматривает циклодекстринсодержащие полимерные соединения для применения при доставке в организм терапевтических агентов. Данное
40 изобретение также предусматривает соединения для применения при регулируемой доставке лекарств, которые способны высвобождать терапевтический агент с направленной, предсказуемой и контролируемой скоростью.

Соответственно, один аспект данного изобретения относится к полимерному
45 конъюгату, включающему звенья циклодекстрина, терапевтический агент и, возможно, лиганд. Полимер может быть линейным или разветвлённым и может быть получен поликонденсацией циклодекстринсодержащих мономеров, сополимеризацией одного или
50 более циклодекстринсодержащих мономеров и одного или более сомономеров, не содержащих циклодекстриновые звенья. Далее, настоящее изобретение предусматривает

также циклодекстринсодержащие полимеры, полученные прививкой циклодекстрина на уже готовый полимер. Фрагменты циклодекстринов согласно изобретению включают, не ограничиваясь этим, α -, β - и γ -циклодекстрины и их окисленные формы. В зависимости от желательного отношения лекарство/полимер, терапевтический агент может быть присоединён к мономеру при помощи линкера до стадии полимеризации или может быть потом привит на полимер через возможный линкер или же может быть присоединён к полимеру в составе комплекса включения или путём реакций хозяин – гость.

Для иллюстрации изобретения один аспект изобретения представлен полимерным соединением формулы I:



(I)

где

P обозначает линейную или разветвлённую цепь;

CD обозначает циклический фрагмент, например, циклодекстрин;

L_1 , L_2 и L_3 , независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

D, независимо в каждом случае, обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

T, независимо в каждом случае, обозначает целевой лиганд или его предшественник;

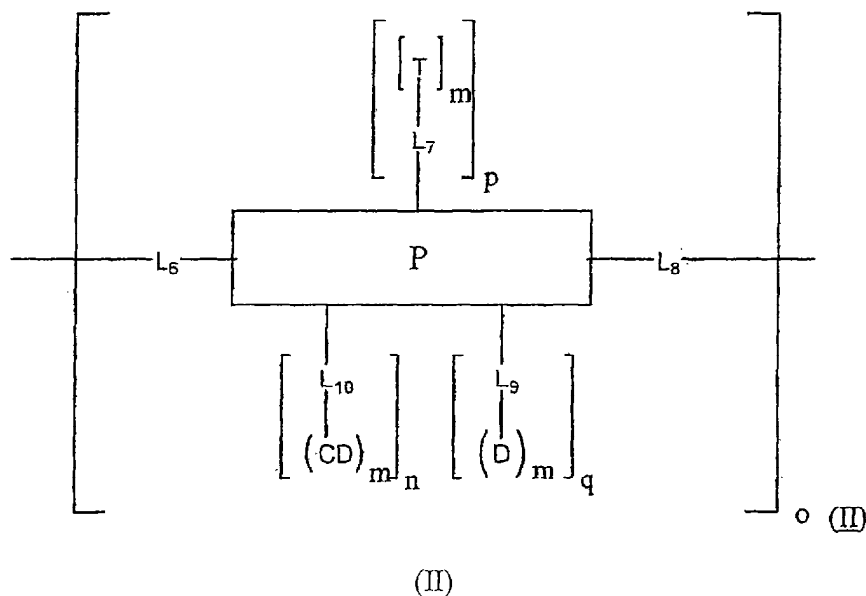
a, m и v, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

b представляет целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5) и

п и w, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5),

причём или полимерная цепь содержит звенья циклодекстрина, или п равно по меньшей мере 1.

Другой вариант изобретения представлен полимерным соединением формулы II:



где

P обозначает мономерное звено полимера;

T, независимо в каждом случае, обозначает целевой лиганд или его предшественник;

L₆, L₇, L₈, L₉ и L₁₀, независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

CD, независимо в каждом случае, обозначает циклический фрагмент, такой как звено циклодекстрина или его производного;

D, независимо в каждом случае, обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

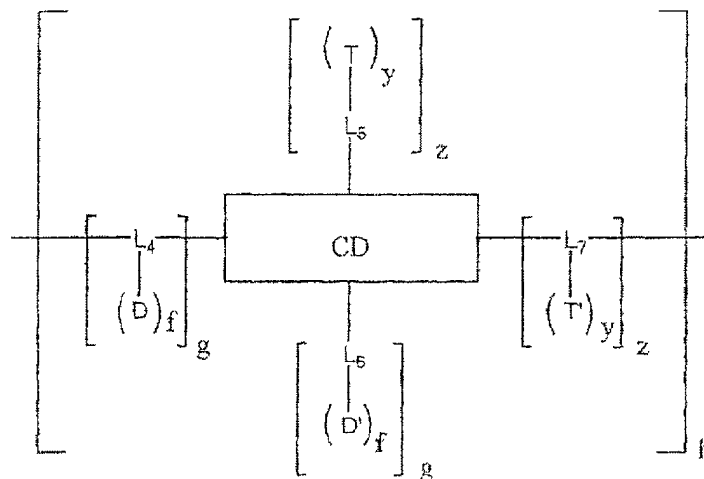
m, независимо в каждом случае, обозначает целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

o обозначает целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно, < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5) и

p, n и q, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до 10 (предпочтительно, от 0 до 8, от 0 до 5, от 0 до 3 или даже от 0 до примерно 2);

причём CD и D, предпочтительно каждый, обозначает по меньшей мере один фрагмент (предпочтительно, по меньшей мере 5, 10, 25, 50 или даже >100 фрагментов) в соединении.

Другой вариант настоящего изобретения относится к соединению формулы III:



III

где

CD обозначает циклический фрагмент, например, звено циклодекстрина или его производного;

L_4 , L_5 , L_6 и L_7 , независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

D и D', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или разные терапевтические агенты или их пролекарства;

T и T', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или различные лиганды или их предшественники;

f и y, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

g и z, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до 10 (предпочтительно, от 0 до 8, от 0 до 5, от 0 до 3 или даже от 0 до примерно 2);

h обозначает целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5);

причём по меньшей мере одно значение (и предпочтительно, по меньшей мере 5, 10 или даже по меньшей мере 20, 50 или >100) g равно целому числу, превышающему 0.

Другой аспект данного изобретения относится к способу получения терапевтических циклодекстринсодержащих полимерных конъюгатов, описанных в данном описании.

Ещё один аспект данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение или полимер, описанный выше.

Ещё один аспект данного изобретения относится к фармацевтической дозированной форме, содержащей полимерный конъюгат, описанный в данном описании.

Ещё один аспект данного изобретения относится к способу лечения субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества любого из полимерных конъюгатов, описанных в данном описании.

Ещё один аспект данного изобретения относится к способу осуществления фармацевтического бизнеса, включающего производство, лицензирование или распространение наборов, содержащих или относящихся к любому из полимерных конъюгатов, описанных в данном описании.

В некоторых вариантах эти терапевтические полимерные конъюгаты повышают стабильность лекарств и/или растворимость терапевтического агента при применении *in vivo*. Далее, за счёт выбора линкерных групп из разнообразных групп полимерные конъюгаты позволяют обеспечить способы регулируемого высвобождения терапевтических и/или биоактивных агентов или улучшить *in vivo* безопасность и/или терапевтическую эффективность терапевтического/ биоактивного агента. В некоторых вариантах полимерные конъюгаты являются биорасщепляемыми или биоразрушаемыми.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 отражает стратегию варьирования состава полимерных конъюгатов для получения нужных свойств.

Фиг. 2 показывает эффект влияния длины пептида на скорость высвобождения лекарства для полимера CD, нагруженного лекарством.

На Фиг. 3 показано влияние, которое включаемый камптотецин имеет на повышение стабильности камптотецина, например, ингибирование раскрытия кольца лактона.

На Фиг. 4 показано изучение раскрытия кольца лактона в буферном растворе KH_2PO_4 при pH 7,4.

На Фиг. 5a и 5b показано протекание полимеризации при изменении времени полимеризации.

Фиг. 6 иллюстрирует высвобождение СРТ из **HG6** и **HGGG6** при 37°C после выдержки в течение 24 часов в буферных растворах при pH в интервале от 1,1 до 13,1.

На Фиг. 7 показано исследование биоразлагаемого полимера CD-BisCys-SS-Peg3400 методом ЖХВР.

На Фиг. 8 показана кривая роста опухоли как функция времени для D5W, СРТ, иринотекана, **LGGG10** при самых высоких испытанных дозах (18 мг СРТ/кг) и других трёх конъюгатов с высоким молекулярным весом (**HGGG6**, **HG6** и **HGGG10**) при их МТД для ксенографта мыши.

На Фиг. 9 показаны кривые роста опухолей для **HGGG6**, **HG6** и **HGGG10** для ксенографта мыши.

На Фиг. 10 представлены кривые роста опухолей для **LGGG10** и **HGGG10** при дозах для каждого 9 мг на СРТ/кг для ксенографта мыши.

На Фиг. 11 показаны средние величины потери массы тела (МВW) как функция времени для D5W, СРТ, иринотекана и трёх конъюгатов, содержащих высокомолекулярный полимер, при их МТД для ксенографта мыши.

На Фиг. 12 показана корреляция концентрации СРТ (нг/мг ткани) и размера опухоли (в мг) для ксенографта мыши.

Подробное описание изобретения.

I. Обзор.

Данное изобретение относится к новым составам терапевтических циклодекстринсодержащих полимерных соединений, предназначенных для доставки терапевтических агентов. Согласно некоторым вариантам эти циклодекстринсодержащие полимеры увеличивают стабильность лекарства и/или его растворимость и/или снижают токсичность и/или повышают эффективность маленькой молекулы терапевтического агента при применении *in vivo*. Согласно некоторым вариантам полимеры могут быть использованы для доставки в организм терапевтических агентов, таких как камптотецин, таксол, доксорубицин и амфотерицин. Далее, путём выбора

линкерных групп и/или целенаправленных лигандов скорость высвобождения лекарства из полимеров может быть приспособлена для регулируемой доставки. Данное изобретение относится также к способам лечения субъектов терапевтическими композициями, описанными в данной заявке. Изобретение далее относится к способам осуществления фармацевтического бизнеса, включающего производство, лицензирование или распределение наборов, содержащих полимерные соединения, описанных в данной заявке.

В общем, данное изобретение предусматривает водорастворимые биосовместимые полимерные конъюгаты, содержащие водорастворимый биосовместимый полимер, ковалентно соединённый с биоактивными фрагментами при помощи групп, которые расщепляются в биологической среде с высвобождением биоактивных соединений. Согласно некоторым вариантам полимер содержит циклические звенья, чередующиеся со звеньями линкера, которые связывают циклические структуры, например, линейные или разветвлённые полимеры, предпочтительно, линейные полимеры. Циклические фрагменты могут быть любыми подходящими циклическими структурами, такими как циклодекстрины, краун-эфиры (например, 18-краун-6, 15-краун-5, 12-краун-4 и т.д.), циклические олигопептиды (например, содержащие от 5 до 10 остатков аминокислот), криптанды или криптаты (например, криптанд [2.2.2], криптанд-2,1,1 и его комплексы), каликсарены или кавитанды или любая их комбинация. Предпочтительно, циклическая структура является (или модифицирована, чтобы стать таковой) водорастворимой. Согласно некоторым вариантам, например, когда желательно получить линейный полимер, циклическую структуру выбирают таким образом, чтобы в условиях полимеризации точно два фрагмента каждой циклической структуры реагировали с молекулами линкера, с тем чтобы полученный полимер содержал (или по существу состоял из них) чередующиеся ряды циклических фрагментов и молекул линкера, такие как, по меньшей мере, четыре фрагмента из каждого типа звеньев. Подходящие бифункционализированные циклические фрагменты включают многие звенья, которые являются коммерчески доступными и/или пригодными для получения полимеров в соответствии с опубликованными протоколами. Согласно некоторым вариантам конъюгаты растворяются в воде с концентрацией, по меньшей мере, 0,1 г/мл, предпочтительно, по меньшей мере, 0,25 г/мл.

Полимер может быть поликатионным, полианионным или неионным. Поликатионный или полианионный полимер содержит, по меньшей мере, один сайт, который несёт положительный или отрицательный заряд, соответственно. Согласно

некоторым вариантам, по меньшей мере, один фрагмент из линкерных и циклических групп содержит такой заряженный сайт, так что каждое такое звено включает заряженный сайт.

Биоактивный агент, который может быть терапевтическим, диагностическим агентом или адъювантом (таким как радиосенсибилизатор или соединение, которое не обладает значительной активностью, если вводится само по себе, но повышает активность другого терапевтического агента), предпочтительно, составляет, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или даже 35% от веса конъюгата. Согласно предпочтительным вариантам введение полимера пациенту приводит к высвобождению биоактивного агента в течение, по меньшей мере, 6 ч, предпочтительно, в течение, по меньшей мере, 12 или 18 ч. Например, агент может высвобождаться в течение промежутка времени от 6 часов до 1 месяца, от 6 часов до 2 недель, от 6 часов до 3 дней и т.д. Согласно некоторым вариантам скорость высвобождения лекарства зависит, в основном, от скорости гидролиза (в противоположность ферментативному расщеплению), например, скорость высвобождения изменяется меньше, чем в 5 раз, предпочтительно, меньше чем в 2 раза в присутствии гидролитических ферментов. Согласно другим вариантам скорость высвобождения лекарства может в основном зависеть от скорости ферментативного расщепления.

Полимерные конъюгаты согласно данному изобретению могут применяться для повышения растворимости и/или стабильности биоактивного/терапевтического агента, уменьшения возможности протекания взаимодействия лекарственных веществ, уменьшения взаимодействия с элементами крови, включая протеины плазмы, снижения или устранения иммуногенности, защиты терапевтического агента от метаболизма, модулирования кинетики высвобождения лекарства, повышения времени циркуляции, повышения периода полураспада лекарства (например, в сыворотке, или в выбранных тканях, таких как опухоли), ослабления токсичности, повышения эффективности, нормализации метаболизма лекарственных веществ у субъектов разных видов, этнического происхождения и/или рас и/или обеспечения целенаправленной доставки в специфические клетки или ткани. Плохо растворимые и/или токсичные соединения могут особенно выиграть от введения полимерных соединений по изобретению.

II. Определения.

(a) Общие термины.

«Адъювант» означает соединение, которое имеет небольшое терапевтическое значение само по себе, но повышает эффективность терапевтического агента. Примеры адъювантов включают радиосенсибилизаторы, агенты, способствующие трансфекции (такие как хлорокин и его аналоги), хемотактические агенты и хемоаттрактанты, пептиды, которые модулируют адгезию клеток и/или мобильность клеток, агенты, способствующие проникновению в клетки, ингибиторы множественной резистентности к лекарствам и/или бионасосы и т.д.

Термин «агонист», используемый в данном описании, относится к агенту, который имитирует или регулирует (например, усиливает или дополняет) биоактивность нужного белка, или к агенту, который способствует или промотирует (например, усиливает или дополняет) взаимодействие среди полипептидов или между полипептидом и другим веществом (например, стероидом, гормоном, нуклеиновыми кислотами, маленькими молекулами и т.д.). Агонист может быть белком дикого типа или его производным, имеющим, по меньшей мере, одну биоактивность белка дикого типа. Агонист может также быть маленькой молекулой, которая регулирует экспрессию гена или которая увеличивает по меньшей мере одну биоактивность белка. Агонист может также представлять собой белок или маленькую молекулу, которая повышает взаимодействие нужного полипептида с другой молекулой, например, целевым пептидом или нуклеиновой кислотой.

Термин «антагонист», используемый в данном описании, относится к агенту, который снижает (например, подавляет или ингибирует) биоактивность нужного белка, или к агенту, который ингибирует, подавляет или уменьшает (например, дестабилизирует или снижает) возможность взаимодействия между полипептидами или другими молекулами (например, гормонами, стероидами, нуклеиновыми кислотами и т.д.). Антагонист может также являться соединением, которое уменьшает экспрессию гена, представляющего интерес, или которое снижает количество имеющегося белка дикого типа. Антагонист может также быть белком или маленькой молекулой, которая уменьшает или ингибирует взаимодействие между полипептидом и другой молекулой, например, пептидом-мишенью или нуклеиновой кислотой.

Термин «биосовместимый полимер» и «биосовместимость» являются общепризнанными в области полимеров. Например, биосовместимые полимеры включают полимеры, которые не являются сами по себе токсичными по отношению к хозяину (например, животному или человеку) и не разлагаются (если полимер разлагается) со скоростью, которая приводит к образованию мономерных или

олигомерных единиц или других побочных продуктов при токсичных концентрациях в организме хозяина. В некоторых вариантах изобретения биоразложение обычно включает разложение полимера в организме, например, на звенья мономеров, о которых может
5 быть известно, что они не токсичны. Промежуточные олигомерные продукты, полученные в результате такого разложения, могут иметь, однако, различные токсикологические свойства или биоразложение может включать окисление или другие
10 биохимические реакции, которые генерируют молекулы, отличающиеся от мономерных звеньев полимера. Соответственно, согласно некоторым вариантам токсикология биоразлагаемого полимера, предназначенного для применения *in vivo*, например, для
15 имплантации или инъекции пациенту, может быть определена при помощи одного или нескольких анализов на токсичность. Не является необходимым, чтобы любая композиция по изобретению имела степень чистоты, равную 100%, чтобы считаться
20 биосовместимой. Следовательно, композиция может содержать 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или даже меньше биосовместимых полимеров, например, включать полимеры и другие вещества, а также эксципиенты, описанные в данной заявке, и всё ещё быть биосовместимой.

Для того, чтобы определить, является ли полимер или другое вещество биосовместимым, может быть необходимым проведение анализа на токсичность. Такие анализы хорошо известны из уровня техники. Примером такого анализа может быть
30 анализ с живыми клетками карциномы, такими как клетки опухоли GT3TKB, осуществляемый следующим образом: образец разлагается в 1М NaOH при 37°C до полного разложения. Затем раствор нейтрализуют 1М HCl. Примерно 200 мкл образцов
35 разложившихся продуктов с различными концентрациями помещают в планшет с 96 лунками и высевают клетки желудочной карциномы человека (GT3TKB) с плотностью посева 104/лунку. Образцы разложившихся продуктов инкубируют с клетками GT3TKB в
40 течение 48 ч. Результаты анализа могут быть представлены на графиках как зависимость относительного роста в % от концентрации разложившегося продукта в лунке с тканевой культурой. Кроме того, полимеры и составы по изобретению можно оценить при помощи
45 хорошо известных тестов *in vivo*, таких как с использованием подкожных имплантатов у крыс, для того, чтобы подтвердить, что они не вызывают значительного раздражения или воспаления в местах подкожной имплантации.

Термин «биоразлагаемый» широко известен в уровне техники и включает
50 полимеры, композиции и составы, такие как описанные в данной заявке, которые разлагаются во время использования. Биоразлагаемые полимеры обычно отличаются от

небиоразлагаемых тем, что первые могут разлагаться во время использования. Согласно некоторым вариантам такое применение включает применение *in vivo*, например, терапию *in vivo*, а согласно другим вариантам – применение *in vitro*. В общем, разложение, обусловленное биоразложением, включает разложение биоразлагаемого полимера на звенья его компонентов или переваривание, например, в ходе биохимического процесса, полимера с получением меньших не полимерных звеньев. Согласно некоторым вариантам обычно можно идентифицировать два различных типа биоразложения. Например, один вид биоразложения может включать расщепление связей (или ковалентных, или других) в цепи полимера. При таком биоразложении обычно образуются мономеры и олигомеры, и даже более типичны случаи, когда такое биоразложение возникает за счёт расщепления связи, соединяющей одно или несколько звеньев полимера. В противоположность этому, другой вид биоразложения может включать расщепление связи (или ковалентной, или другой) в боковой цепи или связи, соединяющей боковую цепь с основной цепью полимера. Например, терапевтический агент или другое химическое соединение, присоединённое в виде боковой цепи к основной цепи полимера, могут высвобождаться при биоразложении. Согласно некоторым вариантам во время использования полимера может возникать один или второй, или оба вида биоразложения.

Используемый термин «биоразложение» охватывает оба общих вида биоразложения. Скорость разложения биоразлагаемого полимера часто зависит частично от разных факторов, включая химическую идентичность связи, ответственной за любое разложение, молекулярный вес, кристалличность, биостабильность и степень сшивки такого полимера, физические характеристики (например, форма и размер) имплантата и способ и место введения. Например, чем больше молекулярный вес, чем выше степень кристалличности и/или чем больше биостабильность, тем обычно медленнее биоразложение любого биоразлагаемого полимера. Термин «биоразлагаемый» охватывает вещества и способы, называемые также «биоразрушаемыми».

Согласно некоторым вариантам, когда биоразлагаемый полимер содержит также терапевтический агент или другое вещество, связанное с ним, скорость биоразложения такого полимера можно охарактеризовать скоростью высвобождения таких веществ. В этих случаях скорость биоразложения может зависеть не только от химической идентичности и физических свойств полимера, но также и от идентичности вещества (веществ), введённых в него. Разложение таких композиций включает не только расщепление внутримолекулярных связей, например, при окислении и/или гидролизе, но

также распад межмолекулярных связей, например, диссоциация комплексов хозяин/гость при конкурирующем образовании комплексов с инородными хозяевами включения.

В некоторых случаях полимерные составы согласно изобретению биоразлагаются в течение промежутка времени, применяемого для желательной области применения. Согласно некоторым вариантам, например, при терапии *in vivo*, такое разложение происходит в течение промежутка времени, обычно не превышающего примерно пять лет, один год, шесть месяцев, три месяца, один месяц, 15 дней, пять дней, три дня и даже один день при выдержке в физиологическом растворе при pH между 6 и 8 и температуре между 25°C и 37°C. В других случаях полимер разлагается в течение промежутка времени между одним часом и несколькими неделями в зависимости от области применения.

Используемый термин «биоразрушаемый» относится к полимерам, которые доставляют пролонгированно эффективные количества терапевтического агента в целевую ткань в течение желательного промежутка времени. Так, полимер по изобретению в биологическом окружении ткани хозяина и т.п. согласно одному аспекту подвергается действию гидролитических ферментов и окислительных веществ в ответ на, и по отношению к, воспалительный ответ хозяина.

Это приводит к высвобождению терапевтического агента путём разрыва ковалентных соединительных связей. Так, согласно некоторым вариантам материалы по изобретению используют присущий организму млекопитающего собственный процесс заживления ран для своего разложения, как описано ранее.

Для составов с наночастицами были хорошо изучены биоразлагаемые полимеры: полимолочная кислота, полигликолевая кислота и сополимер молочной и гликолевой кислот. Эти полимеры являются сложными полиэфирами, которые при имплантации в организм подвергаются обычному гидролизу. Продукты этого гидролиза являются биологически совместимыми и подвергающимися метаболизму фрагментами (например, молочная кислота и гликолевая кислота), которые в конце концов удаляются из организма в процессе цикла лимонной кислоты. Продукты биоразложения полимеров образуются с очень небольшой скоростью и, следовательно, не влияют на обычную функцию клеток. Некоторые исследования имплантации этих полимеров при доставке лекарств с помощью матриц, микросфер, имплантатов костей, хирургических нитей и контрацептивов длительного действия доказали их безопасность. Эти полимеры используются также как материалы графтов для искусственных органов и в последнее время как мембраны оснований при изучении создания тканей – *Nature Med.*, 824-826 (1996). Следовательно, такие полимеры были изучены в различных областях и оказались

безопасными для людей. Более важным является то, что эти полимеры одобрены FDA для применения у людей.

Когда полимеры используются для доставки фармакологически активных агентов *in vivo*, существенным является, чтобы сами полимеры были нетоксичными и чтобы они при разложении образовывали нетоксичные продукты разложения при разрушении полимера жидкостями, содержащимися в организме. Однако многие синтетические биоразлагаемые полимеры при разрушении *in vivo* образуют олигомеры и мономеры, которые неблагоприятно воздействуют на окружающую ткань – D. F. Williams. J. Mater. Sci. 1233 (1982). Для снижения токсичности целого полимерного носителя и продуктов его разложения были получены полимеры на основе метаболитов природного происхождения. По всей видимости, наиболее подробно изученными примерами таких полимеров являются сложные полиэфиры на основе молочной и гликолевой кислот и полиамиды на основе аминокислот.

Ряд биоразрушаемых или биоразлагаемых полимеров известен и используется для регулируемого высвобождения фармацевтических веществ. Такие полимеры описаны, например, в патентах США №№ 4 291 013, 4 347 234, 4 525 495, 4 570 629, 4 572 832, 4 587 268, 4 638 045, 4 675 381, 4 745 160 и 5 219 980.

Термин «биогидролизируемая связь» (например, сложноэфирная, амидная, карбонатная, карбаматная или имидная) относится к связи, которая расщепляется (например, эфир расщепляется с образованием гидроксильной группы и карбоновой кислоты) в физиологических условиях. Физиологические условия включают кислую и основную среду пищеварительного тракта (например, желудка кишечника и т.д.), кислая среда опухоли, ферментативное расщепление, метаболизм и другие биологические процессы и предпочтительно относится к физиологическим условиям в позвоночнике, например, млекопитающего.

Используемые в данном описании термины «предшественник сомомера А», «линкер», «линкерная группа» и «фрагмент линкера» относятся к любому соединению с линейной или разветвлённой цепью, симметричному или асимметричному, которое при взаимодействии с предшественником циклодекстринового мономера или другим подходящим циклическим соединением связывает два соединения вместе. В некоторых случаях предшественник сомомера А представляет собой соединение, содержащее по меньшей мере, две функциональные группы, при помощи которых может проходить реакция и соединение при этом циклодекстриновых мономеров. Примеры функциональных групп, которые могут быть одинаковыми или разными, концевыми или

внутренними у предшественника каждого сомомера А, включают, но не ограничиваются этим, аминами, кислотными, имидазольными, гидроксильными, тио-, ацилгалоидными группами, $-C=C-$ или $-C\equiv C-$ и их производные. Согласно предпочтительным вариантам две функциональные группы являются одинаковыми и расположены на концах сомомера. Согласно некоторым вариантам предшественник сомомера А содержит одну или несколько боковых групп с, по меньшей мере, одной функциональной группой, при помощи которой могут быть достигнуты реакция и связывание при этом терапевтического агента или целевого лиганда, или может быть достигнута разветвлённая полимеризация. Примеры функциональных групп, которые могут быть одинаковыми или различными, концевыми или внутренними, являющимися боковыми группами каждого предшественника сомомера А, включают, но не ограничиваются этим, аминогруппы, кислотные, имидазольные, гидроксильные, тиольные, ацилгалоидные, этиленовую и этиновую группы и их производные. Согласно некоторым вариантам боковая группа представляет собой (не)замещённый разветвлённый, циклический или линейный C1-C10 (предпочтительно, C1-C6) алкил или арилалкил, возможно содержащий один или несколько гетероатомов, например, N, O, S, в цепи или кольце.

При сополимеризации предшественника сомомера А с предшественником циклодекстринового мономера два циклодекстриновых мономера могут быть соединены вместе путём соединения первичной гидроксильной группы одного циклодекстринового мономера с первичной гидроксильной группой другого циклодекстринового мономера, путём соединения вторичной гидроксильной группы одного циклодекстринового мономера со вторичной гидроксильной группой другого циклодекстринового мономера или путём соединения первичной гидроксильной группы одного циклодекстринового мономера со вторичной гидроксильной группой другого циклодекстринового мономера. Соответственно, в конечном сополимере могут существовать комбинации таких связей. И предшественник сомомера А, и сомономер А конечного сополимера может быть нейтральным, катионным (например, при наличии протонированных групп, например, таких как четвертичные аммониевые группы) или анионным (например, при наличии депротонированных групп, например, таких как сульфатные, фосфатные, боринатные или карбоксилатные). Заряд сомомера А в сополимере можно регулировать путём изменения pH. Примеры подходящих предшественников сомомера А включают, но не ограничиваются этим, сукцинимиды (например, дитиобис(сукцинимидилпропионат) DSP, и дисукцинимидилсуберат (DSS)), глутаматы и аспартаты.

Циклодекстринсодержащие полимеры по изобретению могут быть линейными, разветвлёнными или привитыми. Используемый термин «линейный циклодекстринсодержащий полимер» относится к полимеру, содержащему (α , β или γ) циклодекстриновые молекулы или их производные, которые включены в полимерную цепь. Используемый термин «привитой циклодекстринсодержащий полимер» относится к полимеру, содержащему (α , β или γ) циклодекстриновые молекулы или их производные, которые подвешены к полимерной цепи. Термин «привитой полимер» относится к полимерной молекуле, которая содержит дополнительные фрагменты, присоединённые как боковые группы вдоль основной цепи полимера. Термин «привитая полимеризация» обозначает процесс полимеризации, в котором боковая цепь прививается на полимерную цепь, причём боковая цепь состоит из звеньев одного или нескольких других мономеров. Свойства полученного привитого сополимера, такие как, например, растворимость, точка плавления, абсорбция воды, смачиваемость, механические свойства, поведение при абсорбции и т.д. отличаются более или менее от свойств первоначального полимера как функция типа и количества привитых мономеров. Термин «коэффициент прививки» означает количество привитых мономеров в весовых процентах в расчёте на вес полимера. Используемый термин «разветвлённый циклодекстринсодержащий полимер» относится к полимеру со множеством разветвлений, причём каждое ответвление является начальной точкой другой полимерной цепи, и каждый участок полимерной цепи может содержать множество (α , β или γ) циклодекстриновых молекул или их производных, включённых в состав цепи или привитых на полимерную цепь.

Термин «циклодекстриновый фрагмент» относится к (α , β или γ) циклодекстринам или их производным, которые могут быть в их окисленной или восстановленной формах. Циклодекстриновые фрагменты могут содержать линкеры. Терапевтические агенты и/или целевые лиганды могут быть также соединены с этими фрагментами при помощи возможного линкера. Связь может быть ковалентной (возможно, через биогидролизуемые связи, например, эфирные, амидные, карбаматные и карбонатные) или может быть комплекс хозяин – гость между циклодекстриновым производным и терапевтическим агентом и/или целевым лигандом или возможными линкерами для каждого. Циклодекстриновые фрагменты могут также включать один или более карбогидратных фрагментов, предпочтительно, простых карбогидратных фрагментов, таких как галактоза, присоединённая к циклическому ядру или непосредственно (то есть через карбогидратную связь) или через линкерную группу.

Термин «ED₅₀» обозначает дозу лекарственного вещества, которая обеспечивает 50% максимального ответа или эффекта.

Термин «эффективное количество» соединения в отношении заявленного способа лечения относится к количеству терапевтического агента в препарате, которое при применении в желательной схеме лечения обеспечивает положительный эффект согласно клинически приемлемым стандартам лечения или профилактики конкретного заболевания.

Термин «провайдеры услуг здравоохранения» относится к отдельным людям или организациям, которые обеспечивают услуги по охране здоровья человеку, обществу и т.д. Примеры «провайдеров услуг здравоохранения» включают врачей, госпитали, общества заботы о пожилых, квалифицированных сиделок, учреждения по уходу, клиники, многопрофильные клиники, отдельные амбулаторные центры, клиники семейных врачей и НМО.

Термин «инструкция(-и)» означает документы, в которых описаны релевантные вещества или методики, относящиеся к набору. Эти материалы могут включать любую комбинацию следующих элементов: известную информацию, перечень компонентов, информацию об их доступности (информацию о покупке и т.д.), краткие или подробные протоколы по применению наборов, данные о недостатках, ссылки, технические детали и любые другие документы. Инструкции могут содержаться в наборе или в виде отдельного компонента, или в бумажной форме, или в электронном виде на машиночитаемом носителе или выгруженной из интернета, или в виде записи. Инструкции могут включать один или несколько документов и в них можно включать новые дополнения.

Термин «набор» обозначает комбинацию, по меньшей мере, двух компонентов, составляющих набор. Вместе эти компоненты составляют функциональную единицу для данной цели. Индивидуальные компоненты могут быть упакованы вместе или отдельно. Например, набор, содержащий инструкцию по применению, может физически включать или не включать инструкцию с другими индивидуальными компонентами. Вместо этого инструкция может быть отдельным компонентом в бумажной форме или в электронном виде на машиночитаемом носителе или выгруженной из интернета, или в виде записи.

Термин «LD₅₀» означает дозу, которая является летальной для 50% субъектов.

Термины «пациент» или «субъект», подвергающийся лечению заявленным способом, может относиться к человеку или не относиться к нему.

Термин «полимеризация» согласно изобретению включает радикальный, анионный и катионный механизмы, а также реакции бифункциональных соединений

(аналогично образованию найлона, например, взаимодействие молекул, каждая из которых содержит две или несколько различных функциональных групп, которые реагируют друг с другом (но предпочтительно, не могут реагировать в одной молекуле из-за стерических, конформационных и других препятствий) или реакции двух или нескольких различных соединений, каждое из которых содержит две или несколько функциональных групп, которые реагируют только с функциональными группами других соединений (то есть межмолекулярные реакции)), а также катализируемую металлами реакцию полимеризации, такую как метатезис олефинов, и другие реакции полимеризации, известные из уровня техники.

Термин «профилактическое или терапевтическое» лечение является общепринятым и включает введение хозяину одного или нескольких соединений по изобретению. Если соединение вводится до клинического проявления нежелательного состояния (например, болезни или другого нежелательного состояния животного), тогда лечение является профилактическим, а именно, оно защищает организм хозяина от развития нежелательного состояния, а когда оно вводится после проявления нежелательного состояния, лечение является терапевтическим (то есть соединение предназначено для уменьшения, улучшения или стабилизации существующего нежелательного состояния или побочных эффектов).

Термин «предотвращение» является общепринятым и при использовании в отношении какого-либо состояния, такого как локальный рецидив (например, боли), болезни, такой как рак, синдрома, такого как сердечный приступ, или другого состояния, этот термин хорошо понятен и включает введение композиции, которая уменьшает частоту или наступление симптомов такого состояния у субъекта по сравнению с субъектом, которому композиция не вводится. Так, предотвращение рака включает, например, снижение количества обнаруживаемых канцерогенных образований у популяции пациентов, получающих терапевтическое лечение, по сравнению с популяцией, не получающей этого лечения, и/или замедление появления обнаруживаемых канцерогенных образований у пациентов, получающих терапевтическое лечение, по сравнению с популяцией, не получающей этого лечения, например, в статистически и/или клинически значимом количестве. Предотвращение инфекции включает, например, уменьшение числа диагнозов инфекции у популяции пациентов, получающих лечение, по сравнению с популяцией, не получившей лечения, и/или замедление появления симптомов инфекции у популяции пациентов, получающих терапевтическое лечение, по сравнению с популяцией, не получающей этого лечения.

Предотвращение появления боли включает, например, снижение частоты или замедление ощущения боли, проявляющееся у субъектов, получивших лечение, по сравнению с популяцией, не получившей лечения.

Используемый термин «терапевтический агент» включает любое синтетическое или природное биологически активное соединение или композицию, которые при введении в организм (человека или животного) вызывают желательные фармакологический, иммуногенный и/или физиологический эффект путём локального и/или системного действия. Следовательно, этот термин охватывает те соединения или химикаты, которые традиционно считаются лекарствами, вакцинами и биофармацевтиками, включая такие соединения как белки, пептиды, гормоны, нуклеиновые кислоты, генные конструкции и т.п. Более конкретно, термин «терапевтический агент» включает соединения или композиции для применения во всех основных терапевтических областях, включая, но не ограничиваясь этим, адъюванты, противoinфекционные средства, такие как антибиотики и противовирусные агенты; анальгетики и анальгетические комбинации, анорексики, противовоспалительные агенты, противоэпилептические средства, локальные общие и местные анестетики, гипнотические, седативные средства, антипсихотические агенты, нейролептические агенты, антидепрессанты, анксиолитики, антагонисты, агенты, блокирующие действие на нейроны, антихолинергические и холиномиметические агенты, антимускариновые и мускариновые агенты, антиадренергетики, антиаритмические средства, антигипертензивные средства, гормоны и питательные вещества, противоартритные средства, противоастматические агенты, противосудорожные средства, антигистаминные, противорвотные средства, антинеопластические агенты, противозудные средства, антипиретики, противоспазматические средства, сердечно-сосудистые препараты (включая блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы, бета-агонисты и антиаритмические средства), диуретики, вазодилаторные средства, стимулянты центральной нервной системы, препараты от кашля и простуды; противоотёчные средства, диагностические препараты, стимулянты роста костей и ингибиторы резорбции костей; иммуносуппрессанты, релаксанты мышц, психостимулянты, транквилизаторы, белки, пептиды и их фрагменты (природные, синтезированные химическим путём или рекомбинантным путём); и нуклеиновые кислоты (полимерные формы двух или более нуклеотидов, рибонуклеотиды (РНК) или дезоксирибонуклеотиды (ДНК), включая двухнитевую и одонитевую формы, генные конструкции, векторы экспрессии, антисмысловые олигонуклеотиды и т.п.), маленькие молекулы (например, доксорубицин)

и другие биологически активные макромолекулы, такие как, например, белки и ферменты. Агент может быть биологически активным, используемым в медицине, включая ветеринарию, в сельском хозяйстве, например, для растений, а также в других областях. Термин «терапевтический агент» также включает, без ограничения, медикаменты; витамины; минеральные добавки; вещества, используемые для лечения, профилактики, диагноза, лечения или ослабления заболевания или болезни; или вещества, которые влияют на структуру или функцию организма; или пролекарства, которые становятся биологически активными или более активными после того, как их поместили в заданное физиологическое окружение.

Используемый термин «низкая растворимость в воде» относится к нерастворимым в воде соединениям, имеющим плохую растворимость в воде, которая меньше 5 мг/мл при физиологическом pH (6,5 - 7,4). Предпочтительно их растворимость в воде меньше 1 мг/мл, более предпочтительно, меньше 0,1 мг/мл. Желательно, чтобы лекарство было стабильным в воде в виде дисперсии; может быть желательной лиофилизированная или высушенная распылением форма.

Примеры некоторых предпочтительных водонерастворимых лекарств, включают иммуносупрессанты, такие как циклоспорины, включая циклоспорин (циклоспорин А), иммуноактивные агенты, противовирусные и противогрибковые средства, антинеопластические средства, анальгетики и противовоспалительные агенты, антибиотики, антиэпилептики, анестетики, гипнотические, седативные средства, антипсихотические агенты, нейролептики, антидепрессанты, анксиолитики, противосудорожные средства, антагонисты, агенты, блокирующие нейроны, антихолинергические и холинергические средства, антимускариновые и мускариновые агенты, антиадренергические и противоаритмические средства, антигипертензивные агенты, гормоны и нутрицевтики. Подробное описание этих и других подходящих лекарств можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, Mack Publishing Co., Philadelphia, Pa.

Термин «терапевтический индекс» относится к терапевтическому индексу лекарства, определённого как LD₅₀/ED₅₀.

Термин «терапевтически эффективное количество» соединения по отношению к способу лечения относится к количеству соединения(-ий) в препарате, которое будучи введённым по желательной схеме лечения и при желательной дозе (млекопитающему, предпочтительно, человеку), смягчает симптом, улучшает состояние, замедляет начало болезни согласно клинически приемлемым стандартам при лечении расстройства или

состояния или для косметических целей, например, в случае разумного соотношения положительный результат/ риск, приемлемого для любого медицинского лечения.

Термин «терапевтически эффективная доза» соединения в отношении способа лечения относится к количеству соединения(-ий) в препарате, которое будучи введённым по желательной схеме лечения ежедневно (млекопитающему, предпочтительно, человеку), смягчает симптом, улучшает состояние, замедляет начало болезни согласно клинически приемлемым стандартам при лечении расстройства или состояния или для косметических целей, например, в случае разумного соотношения положительный результат/риск, приемлемого для любого медицинского лечения.

(б) Химические термины.

Алифатическая цепь охватывает классы алкилов, алкенилов, алкинилов, определённых ниже. Линейная алифатическая цепь ограничивается неразветвлёнными углеродсодержащими радикалами. Используемый термин «алифатическая группа» относится к линейной, разветвлённой или циклической алифатической углеводородной группе и включает насыщенные и ненасыщенные алифатические группы, такие как алкильная группа, алкенильная группа и алкинильная группа.

Алкил относится к полностью насыщенному разветвлённому или неразветвлённому углеродсодержащему радикалу с определённым числом атомов углерода или же содержащему до 30 атомов углерода, если это число не указано. Например, алкил с 1-8 атомами углерода относится к таким радикалам, как метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил и октил и к изомерам этих радикалов. Алкил с 10-30 атомами углерода включает децил, ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил, октадецил, нонадецил, эйкозил, генэйкозил, докозил, трикозил и тетракозил. Согласно предпочтительным вариантам линейный или разветвлённый алкил содержит 30 и менее атомов в цепи (например, C1-C30 для линейных цепей, C3-C30 для разветвлённых цепей) и более, предпочтительно, 20 атомов и менее. Точно также предпочтительные циклоалкилы содержат 3-10 атомов углерода в кольце и более предпочтительно 5, 6 или 7 атомов углерода в кольце.

Более того, термин «алкил» (или «низший алкил»), используемый по всему тексту описания, в примерах и в формуле изобретения, включает и «незамещённые алкилы» и «замещённые алкилы», последний термин относится к алкилам, имеющим заместители в месте водорода у одного или нескольких атомов углерода в углеводородной цепи. Такие заместители могут включать, например, галоид, гидроксил, карбонил (например,

карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфирная группа, тиоацетатная группа или тиоформиатная), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, amino, амидо, амидин, циано, нитро, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидо, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический или гетероароматический радикал. Специалистам ясно, что группы, являющиеся заместителями в углеводородной цепи, сами могут быть замещёнными, если это желательно. Например, заместители замещённого алкила могут включать замещённые и незамещённые amino, азидо, имино, амидо фосфорил (включая фосфонатные и фосфинатные), сульфонильные группы (включая сульфатные группы, сульфонамидогруппы, сульфамойльные и сульфонатные группы) и силильные группы, а также эфирные группы, алкилтиогруппы, карбонильные группы (включая кетонные, альдегидные, карбоксилатные и сложноэфирные группы), $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ и т.п. Примеры замещённых алкилов описаны ниже. Циклоалкилы могут быть дополнительно замещены алкилами, алкенилами, алкоксилами, алкилтиогруппами, aminoалкилами, карбонилзамещёнными алкилами, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ и т.п.

Если число атомов углерода не оговорено особо, термин «низший алкил» означает алкил, определённый выше, но содержащий от одного до десяти атомов углерода, более предпочтительно от одного до шести атомов углерода в цепи, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор.бутил и трет.бутил. Точно также «низший алкенил» и «низший алкинил» имеют одинаковую длину цепи. В данном описании предпочтительными алкильными группами являются низшие алкилы. Согласно предпочтительным вариантам заместитель, называемый алкилом, представляет собой низший алкил.

Термин «алкилтио» относится к алкильной группе, определённой выше, содержащей серосодержащий радикал, присоединённый к алкилу. Согласно предпочтительным вариантам «алкилтио» является одним из $-(\text{S})$ -алкила, $-(\text{S})$ -алкенила, $-(\text{S})$ -алкинила и $-(\text{S})-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_1$, где m и R_1 определены ниже. Примеры алкилтиогрупп включают метилтио, этилтио и т.п.

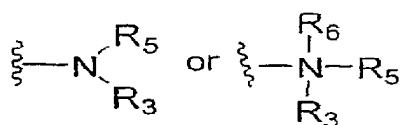
Термин «алкенил» относится к любому разветвлённому или неразветвлённому, ненасыщенному углеродсодержащему радикалу, содержащему определённое число атомов углерода или до 26 атомов углерода, если число атомов углерода не оговорено, и имеющему одну или более двойных связей в радикале. Алкенил, содержащий 6-26 атомов углерода, представлен гексенилом, гептенилом, октенилом, ноненилом, деценилом, индеценилом, доденилом, тридеценилом, тетрадеценилом, пентадеценилом,

гексадеценилом, гептадеценилом, октадеценилом, нонадеценилом, экозенилом, генэйкозенилом, докозенилом, трикозенилом и тетракозенилом и их различными
 5 изомерными формами, причём ненасыщенная связь (связи) может быть расположена в любом месте радикала и может иметь (Z)- или (E)-конфигурацию в отношении двойной связи (связей).

Термин «алкинил» относится к углеводородным радикалам, имеющим одну или
 10 несколько тройных связей.

Термины «алкоксил» или «алкокси» относятся к алкильной группе, определённой
 ниже, содержащей кислородный радикал, присоединённый к этой группе. Примеры
 15 алкоксильных групп включают метокси, этокси, пропокси, трет.бутокси и т.п. «Простой эфир» является соединением, в котором два углерода ковалентно связаны кислородом. Соответственно, заместитель в алкиле, который делает алкил радикалом, содержащим
 20 группу простого эфира, является или напоминает алкоксил, например, может обозначать —О-алкил, —О-алкенил, —О-алкинил, —(O)—(CH₂)_m—R₁, где m и R₁ описаны ниже.

Термины «амин» и «амино» являются общеизвестными и относятся как к
 25 незамещённым, так и к замещённым аминам, например, к фрагменту, который может быть представлен общей формулой:



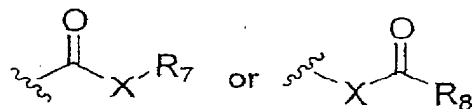
где R₃, R₅ и R₆, каждый независимо, обозначает водород, алкил, алкенил,
 35 —(CH₂)_m—R₁, или R₃ и R₅ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероцикл, содержащий от 4 до 8 атомов в кольце;

R₁ обозначает алкенил, арил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклил или полициклил;
 40 и m обозначает ноль или целое число в пределах от 1 до 8. В предпочтительных вариантах только один из R₃ или R₅ может быть карбонилем, например, R₃, R₅ и атом азота вместе не образуют имид. Согласно более предпочтительным вариантам R₃ и R₅ (и

возможно R₆) каждый независимо обозначает водород, алкил, алкенил или —(CH₂)_m—R₁.
 45 Так термин «алкиламин» обозначает аминогруппу, определение которой дано выше, содержащую замещённый или незамещённый алкил, а именно, по меньшей мере, один из R₃ и R₅ является алкилом. Согласно некоторым вариантам аминогруппа или

алкиламинная группа является основной, имеет $pK_a > 7,00$. Протонированные формы этих функциональных групп имеют величины pK_a по отношению к воде выше 7,00.

Термин «карбонил» является общепризнанным и включает фрагменты общей формулы:



где X обозначает связь или представляет собой кислород и серу, и R_7 обозначает водород, алкил, алкенил, $-(CH_2)_m-R_1$ или фармацевтически приемлемую соль, R_8 обозначает водород, алкил, алкенил, $-(CH_2)_m-R_1$, где m и R_1 обозначены выше. Когда X является кислородом и R_7 или R_8 не являются водородом, формула обозначает сложноэфирную группу. Когда X обозначает кислород и R_7 имеет значение, указанное выше, эта группа называется карбоксильной и, в частности, когда R_7 обозначает водород, формула представляет «карбоксильную группу». Когда X обозначает кислород и R_8 обозначает водород, формула относится к «формиату». В общем, когда атом кислорода в вышеприведённой формуле замещён серой и R_7 и R_8 не являются водородом, формула представляет «тиоэфирную группу». Когда X обозначает серу и R_7 обозначает водород, формула отражает «тиоформиатную» группу. С другой стороны, когда X обозначает связь и R_7 не является водородом, вышеуказанная формула отражает «кетонную» группу. Когда X обозначает связь, R_7 обозначает водород, вышеприведённая формула представляет «альдегидную» группу.

Термин «дериватизованный» относится к химически модифицированным соединениям. Химические модификации могут быть искусственными, такими как образование лекарственного вещества, природными, как например, образование метаболитов. Специалисту очевидно, что существуют многие способы модификации молекул, такие как окисление, восстановление, электрофильное/ нуклеофильное замещение, алкилирование, образование сложного эфира/амида и т.п. Например, циклодекстрины по изобретению могут быть химически модифицированы аминированием, тозилрованием или иодированием до их ковалентного присоединения к полимерной матрице. Точно также могут быть химически модифицированы терапевтические агенты при получении пролекарств (например, глицин-камптотецина).

Термины «гетероциклил» или «гетероциклическая группа» относятся к 3-10-членным кольцевым структурам, более предпочтительно, к 3-7-членным циклам, которые

включают от одного до четырёх гетероатомов. Гетероциклы могут также быть полициклами. Гетероциклические группы включают, например, тиофен, тиантрен, фуран, пиран, изобензофуран, хромен, ксантен, феноксатин, пиррол, имидазол, пиразол, изотиазол, изоксазол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, пиримидин, фенантролин, феназин, фенарсазин, фенотиазин, фуразан, феноксазин, пирролидин, оксолан, тиолан, оксазол, пиперидин, пиперазин, морфолин, лактоны, лактамы, такие как азетидиноны и пирролидиноны, сультамы, сультоны и т.п. Гетероциклическое кольцо может быть замещено в одном или нескольких положениях заместителями, описанными выше, такими как, например, галоген, алкил, аралкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гидроксил, amino, нитро, сульфгидрил, имино, амидо, фосфат, фосфонат, фосфинат, карбонил, карбоксил, силлил, сульфоамил, сульфинил, эфирная группа, алкилтио, сульфонил, кетонная группа, альдегидная группа, сложноэфирная группа, гетероцикл, ароматическая группа или гетероароматическая группа, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ и т.п.

Используемый термин «замещённый» включает все возможные заместители в органических соединениях. В широком смысле допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвлённые и неразветвлённые, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители в органических соединениях. Примеры таких заместителей включают, например, описанные выше. Допустимые заместители могут включать один или несколько и могут быть одинаковыми или разными для соответствующих органических соединений. Для целей этого изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанные в данной заявке, которые насыщают свободные валентности гетероатомов. Данное изобретение никоим образом не ограничивается допустимыми заместителями органических соединений.

Термин «гидрокарбил» относится к одновалентному углеводородному радикалу, содержащему углеродные цепи или циклы, содержащие до 26 атомов углерода с присоединёнными к ним атомами водорода. Этот термин включает алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил и арил, группы, которые содержат смесь насыщенных и ненасыщенных связей, карбоциклические кольца и включает комбинации таких групп. Он может относиться к линейным, разветвлённым, циклическим структурам или их комбинациям.

Термин «гидрокарбилен» относится к двухвалентному гидрокарбильному радикалу. Примеры включают алкилен, фенилен или циклогексилен. Предпочтительно, гидрокарбиленовая цепь является полностью насыщенной и/или содержит 1-10 атомов углерода в цепи.

Используемый термин «нитро» обозначает $-\text{NO}_2$; термин «галоген» обозначает $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ или $-\text{I}$; термин «сульфгидрил» обозначает $-\text{SH}$; термин «гидроксил» обозначает $-\text{OH}$; и термин «сульфонил» обозначает $-\text{SO}_2$.

Следует иметь в виду, что термины «замещение» или «замещённый» включают неявное условие, что такое замещение находится в соответствии с допустимой валентностью замещённого атома и заместителя и что замещение приводит к получению стабильного соединения, которое, например, не может внезапно подвергнуться превращению, такому как перегруппировка, циклизация, удаление и т.д.

Аналогичное замещение может быть у алкенильной и алкинильной групп с получением, например, аминоалкенилов, аминоалкинилов, амидоалкенилов, амидоалкинилов, иминоалкенилов, иминоалкинилов, тиаалкенилов, тиаалкинилов, карбонилзамещённых алкенилов или алкинилов.

Используемое в данной заявке определение каждого термина, например, алкила, m , n и т.д., когда он встречается более одного раза в любой структуре, не зависит от его определения в другом положении в этой же структуре.

Термины «трифлил», «тозил», «мезил» и «нонафлил» являются общеизвестными и относятся к трифторметансульфонилю, p -толуолсульфонилю, метансульфонилю и нафтафорбутансульфонилю, соответственно. Термины «трифлат», «тозилат», «мезилат» и «нонафлат» также являются общеизвестными и относятся к трифторметансульфонатному эфиру, p -толуолсульфонатному эфиру, метан-сульфонатному эфиру и нафтафорбутансульфонатному эфиру и к их радикалам, соответственно.

Сокращения Me , Et , Ph , Ms обозначают метил, этил, фенил и метансульфонил, соответственно. Более полный перечень сокращений, используемый химиками-органиками имеется в первом выпуске каждого тома *Journal of Organic Chemistry*; этот перечень обычно есть в таблице, названной «Стандартный перечень сокращений». Сокращения, содержащиеся в этом перечне, и все аббревиатуры, используемые специалистами в данной области, введены в данное описание в качестве ссылок.

Некоторые соединения по изобретению могут существовать в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. Данное изобретение охватывает все такие соединения, включая цис- и трансизомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереомеры, (d)-

изомеры, (l)-изомеры, их рацемические смеси и их другие смеси, все они входят в объём
данного изобретения. В заместителе, таком как алкил, также могут быть дополнительные
асимметричные атомы углерода. Все такие изомеры, а также их смеси входят в объём
данного изобретения.

Если, например, желателен конкретный энантиомер соединения по изобретению,
он может быть получен методом асимметричного синтеза или путём дериватизации при
помощи хирального соединения, когда полученная диастереомерная смесь разделяется и
вспомогательная группа расщепляется с получением желательных чистых энантиомеров.
Или же, когда молекула содержит основную функциональную группу, такую как
аминогруппа, или кислотную функциональную группу, такую как карбоксильная группа,
могут быть получены диастереомерные соли с подходящей оптически активной кислотой
или основанием с последующим разрешением полученных диастереомеров путём
фракционной кристаллизации или методами хроматографии, хорошо известными из
уровня техники, и выделением чистых энантиомеров.

Эквиваленты соединений, описанных выше, включают соединения, которые им
соответствуют и которые имеют те же общие свойства, при этом осуществляют просто
изменение одного или нескольких заместителей, которое не оказывает неблагоприятного
влияния на эффективность соединения. В общем, соединения согласно данному
изобретению могут быть получены способами, показанными на схемах реакций,
например, приведённых ниже, или модификацией этих методов с использованием
доступных исходных веществ, реагентов и обычных методик синтеза. В процессе этих
реакций можно также использовать варианты, которые сами по себе известны, но здесь
не упомянуты.

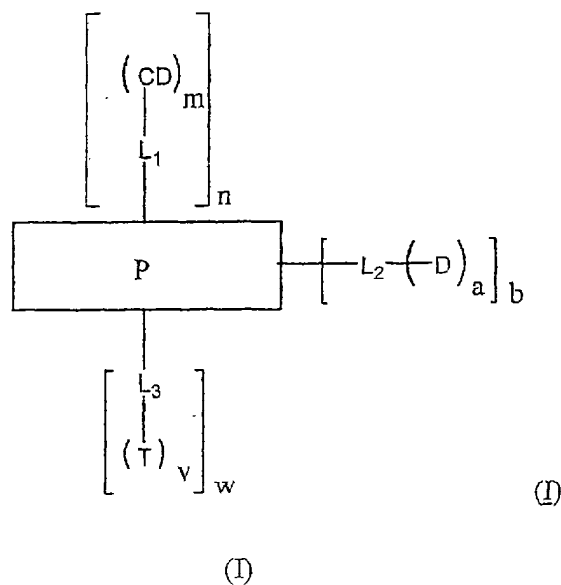
Для целей данного изобретения химические элементы идентифицированы
согласно Периодической Таблице элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and
Physics, 67th ed., 1986-87, внутренняя обложка. Также для целей данного изобретения
термин «углеводород» включает все допустимые соединения, содержащие, по меньшей
мере, один атом водорода и один атом углерода. В широком смысле допустимые
углеводороды включают ациклические и циклические, разветвлённые и неразветвлённые,
карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические органические
соединения, которые могут быть замещёнными или незамещёнными.

III. Примеры применения способа и композиций.

(а) Примеры композиций.

Данное изобретение включает полимерные конъюгаты, такие как полимерные конъюгаты, содержащие циклодекстрин, в которых ковалентно присоединены один или несколько терапевтических/биоактивных агентов. Согласно некоторым вариантам терапевтический агент является маленькой молекулой, макромолекулой, антителом, пептидом, белком, ферментом, нуклеиновой кислотой или полимером, который имеет терапевтическую функцию. Полимеры включают линейные или разветвлённые циклодекстринсодержащие полимеры и полимеры с привитым циклодекстрином. Примеры циклодекстринсодержащих полимеров которые могут быть модифицированы как описано в данной заявке, приведены в патенте США № 6 509 323, опубликованной заявке США № 20020151523 и заявках США с серийным номером №. s 60/417373 и номером 10/372723. Эти полимеры пригодны как носители для доставки маленьких молекул терапевтических веществ и могут повысить стабильность лекарства и растворимость при применении *in vivo*.

Соответственно, один аспект данного изобретения относится к полимерному соединению формулы I:



где

P обозначает линейную или разветвлённую цепь;

CD обозначает циклический фрагмент, например, циклодекстрин;

L_1 , L_2 и L_3 , независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

D, независимо в каждом случае, обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

T, независимо в каждом случае, обозначает целевой лиганд или его предшественник;

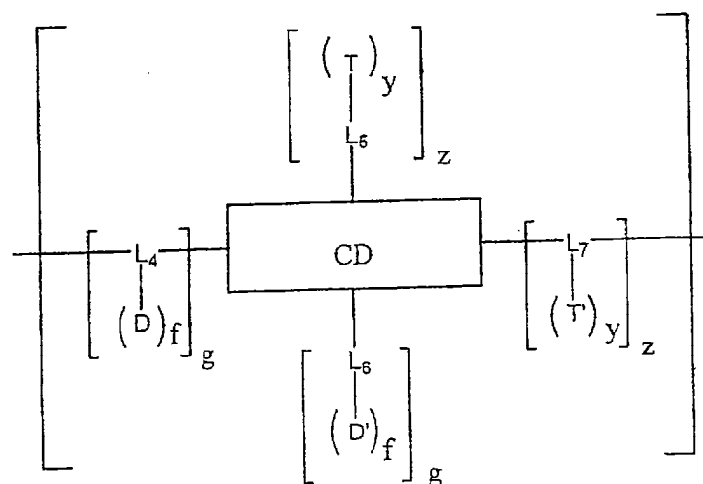
a, m и v, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

p и w, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5), и

b представляет целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5),

причём или P содержит звенья циклодекстрина, или n равно по меньшей мере 1.

Согласно некоторым вариантам P содержит множество циклодекстриновых фрагментов в полимерной цепи в противоположность циклодекстриновым фрагментам, привитым к боковым группам полимерной цепи. Таким образом, согласно некоторым вариантам полимерная цепь формулы (I) дополнительно содержит «n» единиц U, причём «n» обозначает целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5); и U имеет следующую формулу:



где

CD обозначает циклический фрагмент, как циклодекстриновый или его производное;

L₄, L₅, L₆ и L₇, независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

D и D', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или разные терапевтические агенты или их пролекарства;

T и T', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или разные целевые лиганды или их предшественники;

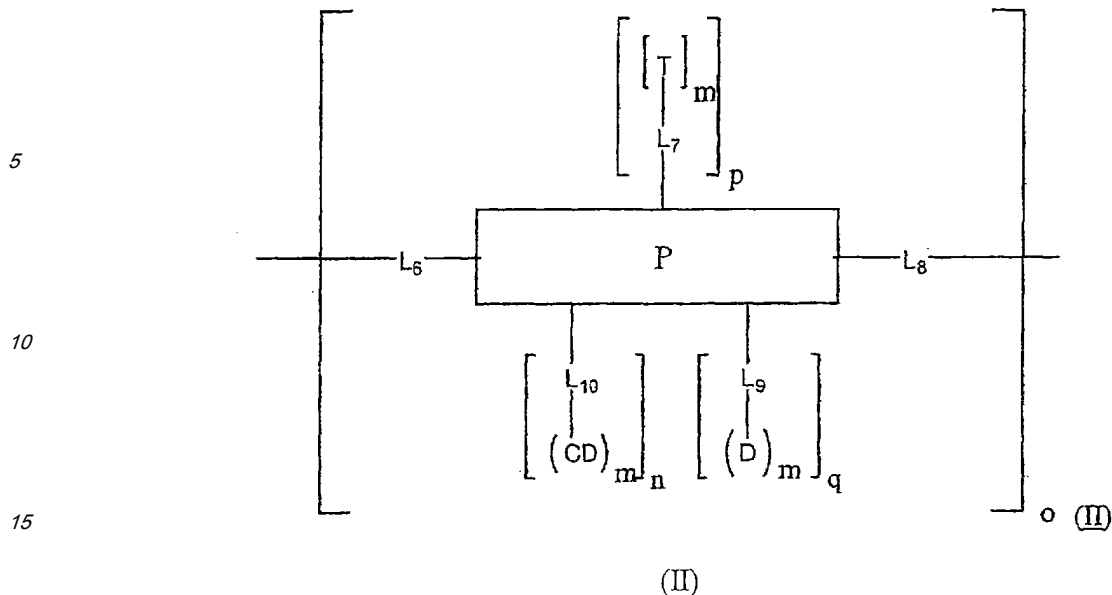
f и y, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 1 до 10; и

g и z, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до 10.

Согласно предпочтительным вариантам L₄ и L₇ обозначают линкерные группы.

Согласно некоторым вариантам полимер может быть выбран из полисахаридов, других небелковых биосовместимых полимеров и их комбинаций, которые содержат, по меньшей мере, одну гидроксильную концевую группу, таких как поливинилпирролидон, поли(оксиэтилен)гликоль (ПЭГ), полисукциновый ангидрид, полисебациновая кислота, ПЭГ-фосфат, полиглутамат, полиэтиленмин, дивиниловый эфир малеинового ангидрида (DIVMA), целлюлоза, пуллуланы, инсулин, поливиниловый спирт (PVA), N-(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA), декстран и гидроксипропилированный крахмал (HES), и которые могут иметь подвешенные боковые группы для прививки терапевтических агентов, целевых лигандов и/или циклодекстринов. Согласно некоторым вариантам полимер может быть биоразлагаемым, таким как поли(молочная) кислота, поли(гликолевая) кислота, поли(алкил-2-цианакрилаты), полиангидриды или полиортоэфир, или биоразрушаемыми, такими как сополимеры полилактид-гликолида и их производные, небелковые полиаминокислоты, полиаминокарбонаты, поли-альфа-аминокислоты, поли-алкилцианакрилаты, полифосфазены или ацилоксиметилполиаспартат и сополимеры полиглутамата и их смеси.

Другой аспект изобретения относится к полимерному соединению, представленному формулой II:



где

P обозначает мономерное звено полимера;

T, независимо в каждом случае, обозначает целевой лиганд или его предшественник;

L₆, L₇, L₈, L₉ и L₁₀, независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

CD, независимо в каждом случае, обозначает циклодекстриновый фрагмент, или его производного;

D, независимо в каждом случае, обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

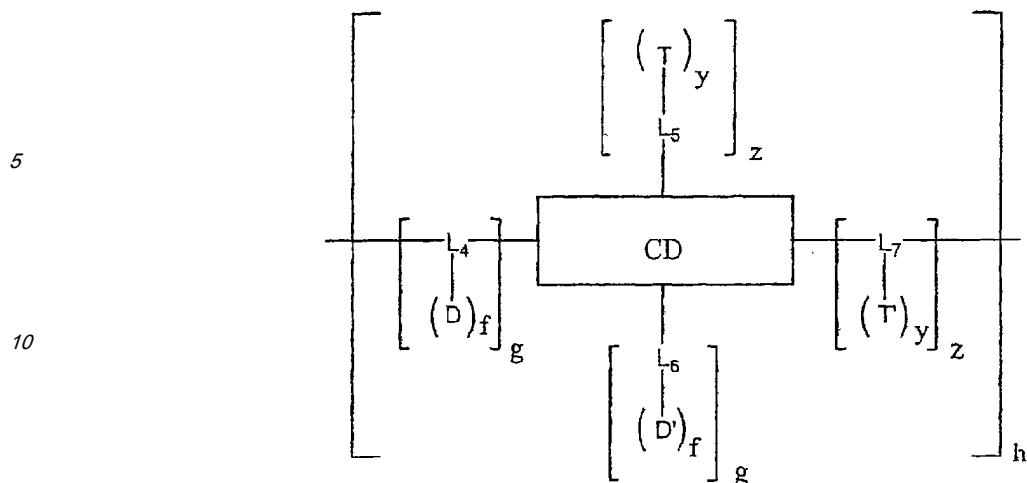
m, независимо в каждом случае, обозначает целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

o обозначает целое число в интервале от 1 до примерно 30 000 (предпочтительно, < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5) и

p, n и q, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до 10 (предпочтительно, от 0 до 8, от 0 до 5, от 0 до 3 или даже от 0 до примерно 2);

причём CD и D, предпочтительно каждый, обозначает, по меньшей мере, один фрагмент (предпочтительно, по меньшей мере 5, 10, 25 или даже 50 или 100 фрагментов) в соединении.

Ещё один аспект относится к соединению формулы III:



III

где

CD обозначает циклический фрагмент, такой как, звено циклодекстрина или его производного;

L_4 , L_5 , L_6 и L_7 , независимо в каждом случае, могут отсутствовать или обозначать группу линкера;

D и D', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или разные терапевтические агенты или их пролекарства;

T и T', независимо в каждом случае, обозначают один и тот же или различные лиганды или их предшественники;

f и y, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 1 до 10 (предпочтительно, от 1 до 8, от 1 до 5 или даже от 1 до 3);

g и z, независимо в каждом случае, обозначают целое число в интервале от 0 до 10 (предпочтительно, от 0 до 8, от 0 до 5, от 0 до 3 или даже от 0 до примерно 2);

h обозначает целое число в интервале от 1 до 30 000 (предпочтительно < 25 000, < 20 000, < 15 000, < 10 000, < 5000, < 1000, < 500, < 100, < 50, < 25, < 10 или даже < 5);

причём по меньшей мере одно значение (и предпочтительно, по меньшей мере, 5, 10 или даже по меньшей мере 20, 50 или 100 значений) g равно целому числу, превышающему 0.

Согласно предпочтительным вариантам L_4 и L_7 обозначают линкерные группы.

Согласно некоторым вариантам используемые полимеры представляют собой циклодекстринсодержащие полимеры, например, полимерная основная цепь включает циклодекстриновые фрагменты. Например, полимер может быть водорастворимым линейным полимером циклодекстрина, полученным обеспечением, по меньшей мере, одного производного циклодекстрина, модифицированного введением одного реакционноспособного сайта в каждое из точно двух положений и взаимодействием производного циклодекстрина с линкером, содержащим точно два реакционноспособных фрагмента, способные к образованию ковалентной связи с реакционноспособными сайтами при условиях полимеризации, которые ускоряют реакцию реакционноспособных сайтов с реакционноспособными фрагментами с образованием ковалентных связей между линкером и производным циклодекстрина, при этом образуется линейный полимер, содержащий чередующиеся звенья производных циклодекстрина и линкеров. Или же полимер может быть водорастворимым линейным циклодекстриновым полимером, содержащим линейную основную цепь, причём этот полимер содержит множество замещённых или незамещённых циклодекстриновых фрагментов и звеньев линкера в линейной основной цепи полимера, при этом каждый из циклодекстриновых фрагментов, отличный от циклодекстринового звена на конце полимерной цепи, присоединён к двум из указанных звеньев линкеров, а каждое звено линкера ковалентно соединяет два циклодекстриновых фрагмента. Согласно ещё одному аспекту полимер является водорастворимым линейным циклодекстриновым полимером, содержащим множество циклодекстриновых фрагментов, ковалентно соединённых вместе при помощи множества линкеров, причём каждый циклодекстриновый фрагмент, отличный от циклодекстринового фрагмента на конце полимерной цепи, присоединён к двум звеньям линкера с образованием линейного циклодекстринового полимера.

Линкерная группа (группы) может представлять собой алкиленовую цепь, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиантарный ангидрид, поли-L-глутаминовую кислоту, поли(этиленимин), олигосахарид, аминокислотную цепь или другую подходящую связь. В некоторых вариантах линкерная группа сама по себе может быть стабильной в физиологических условиях, например, алкиленовая цепь, или она может расщепляться в физиологических условиях, например, в присутствии фермента (например, связующее звено содержит пептидную последовательность, которая является субстратом для пептидазы) или при гидролизе (например, связующее звено содержит гидролизуемую группу, например, сложноэфирную или тиоэфирную). Группы линкера могут быть биологически неактивными, такие как ПЭГ, полигликолевая кислота или полимолочная

кислота, или могут быть биологически активными, такие как олиго- или полипептид, который при высвобождении из фрагментов связывает рецептор, дезактивирует фермент и т.д. Различные олигомерные линкерные группы, которые являются биологически совместимыми и/или биоразрушаемыми, известны из уровня техники и выбор связующего звена может влиять на конечные свойства материала, такие как устойчивость после имплантации, или постепенное разложение, или абсорбция организмом. Линкерная группа может быть присоединена к фрагментам посредством любой подходящей связи или функциональной группы, включая связи углерод-углерод, сложноэфирные связи, группы простого эфира, амидные группы, аминогруппы, карбонатные группы, карбаматные группы, сульфонамидные и т.д.

В некоторых вариантах линкерная группа(-ы) согласно настоящему изобретению представляет собой гидрокарбильную группу, где одна или несколько метиленовых групп могут быть замещены группой Y (при условии, что ни одна из групп Y не соседствует с другой группой Y), при этом каждая группа Y, независимо в каждом случае, выбрана из замещённого и незамещённого арила, гетероарила, циклоалкила, гетероциклоалкила, или $-O-$, $C(=X)$ (где X обозначает NR_1 , O или S), $-OC(O)-$, $-C(=O)O-$, $-NR_1$, $-NR_1CO-$, $C(O)NR_1$, $-S(O_n)-$ (где n равен 0, 1 или 2), $-OC(O)-NR_1$, $-NR_1-C(O)-NR_1-$, $-NR_1-C(NR_1)-NR_1-$, $-B(OR_1)-$; и R_1 , независимо в каждом случае, обозначает H или низший алкил.

Согласно некоторым вариантам группа линкера является дериватизированной или недериватизированной аминокислотой. В некоторых вариантах группы линкера с одной или несколькими концевыми карбоксильными группами могут быть сопряжены с полимером. В некоторых вариантах одна или несколько из этих концевых карбоксильных групп может быть ковалентно присоединена к терапевтическому агенту, целевому фрагменту или циклодекстриновому фрагменту через (тио)эфирную или амидную связь. Согласно другим вариантам линкерные группы с одной или несколькими концевыми гидроксильными, тиольными и аминогруппами могут быть введены в полимер. В предпочтительных вариантах одна или несколько из этих концевых гидроксильных групп может быть ковалентно присоединена к терапевтическому агенту, целевому фрагменту или циклодекстриновому фрагменту через (тио)эфирную, амидную, карбонатную, карбаматную, тиокарбонатную или тиокарбаматную связь. В некоторых вариантах эти (тио)эфирные, амидные, (тио)карбонатные или (тио)карбаматные связи могут быть биогидролизуемыми, то есть способными к гидролизу в биологических условиях.

В некоторых вариантах описанные выше полимеры имеют полидисперсности менее примерно 3 или даже менее примерно 2.

Согласно некоторым вариантам терапевтический агент является маленькой молекулой, пептидом, белком или полимером с терапевтической функцией. В некоторых вариантах этот агент является противораковым (например, камптотecin или его производные), противогрибковым, антибактериальным, антимикотическим или противовирусным. Согласно некоторым вариантам этот агент является агонистом рецептора. Согласно другим вариантам он является ингибитором протеазы. Более того, полимер по изобретению может содержать один терапевтический агент или более, чем один. Например, на полимер при помощи возможных линкеров могут быть привиты два или более противораковых агента, или противораковое лекарство и иммуносупрессат, или антибиотик и противовоспалительный агент. Путём выбора различных линкеров для каждого лекарства можно достичь максимальной дозы и эффективности.

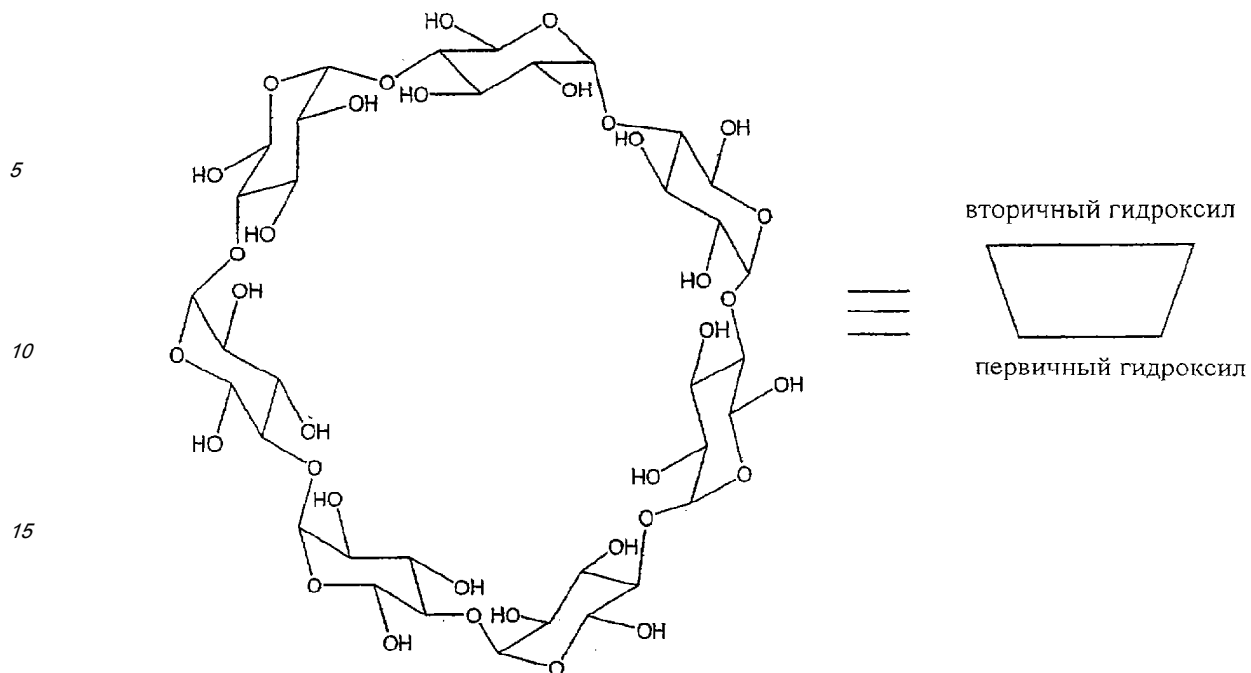
Один аспект данного изобретения относится к способу эффективной доставки некоторых гидрофобных маленьких молекул лекарственных веществ путём ковалентного связывания их с циклодекстриновыми полимерами. Такое сопряжение улучшает растворимость в воде и, следовательно, биодоступность терапевтических агентов. Соответственно, согласно одному из вариантов изобретения терапевтический агент представляет собой гидрофобное соединение с $\log P > 0,4$, $> 0,6$, $> 0,8$, > 1 , > 2 , > 3 , > 4 и даже > 5 . Согласно другим вариантам гидрофобный терапевтический агент, такой как камптотecin, может быть присоединён к другому соединению, такому как аминокислота, до ковалентного присоединения к полимеру. Примеры камптотецина, дериватизованного аминокислотами, показаны на Схеме V.

Полимерные конъюгаты по изобретению, предпочтительно, имеют молекулярные веса в интервале от 10 000 до 500 000, от 30 000 до 200 000 или даже от 70 000 до 150 000 ср.мол.ед.

Согласно некоторым вариантам циклодекстриновые фрагменты составляют, по меньшей мере, до примерно 2%, 5% или 10% вес., до 20%, 30%, 50% и даже 80% вес. Согласно некоторым вариантам терапевтические агенты или целевые лиганды составляют, по меньшей мере, до примерно 1%, 5%, 10% или 15%, 20%, 25%, 30% или даже 35% от веса модифицированного циклодекстрином полимера. Среднечисленный молекулярный вес (M_n) может колебаться в широких пределах, но обычно находится в интервале от примерно 1000 до примерно 500 000 Да, предпочтительно, от примерно 5000 до примерно 200 000 Да и, даже более предпочтительно, от примерно 10 000 до примерно 100 000 Да. Более предпочтительно, когда M_n находится в интервале между примерно 12 000 и 65000 Да. Согласно некоторым другим вариантам M_n находится в

интервале между примерно 3 000 и 150 000 Да. Для конкретного образца полимера по изобретению может быть получен широкий интервал молекулярных весов. Например, молекулы в образце могут иметь молекулярные веса, которые отличаются фактором 2, 5, 10, 20, 50, 100 или более, или которые отличаются от среднего молекулярного веса фактором 2, 5, 10, 20, 50 100 или более. Примеры циклодекстринов включают циклические структуры, состоящие, по существу, из 7-9 сахаридных звеньев, таких как циклодекстрин и окисленный циклодекстрин. Циклодекстриновый фрагмент может содержать линкерную группу, которая образует ковалентную связь между циклической структурой и основной цепью полимера, предпочтительно содержащей от 1 до 20 атомов в цепи, такой как алкильные цепи, включая производные дикарбоновой кислоты (такие как производные глутаровой кислоты, производные янтарной кислоты и т.п.), и гетероалкильные цепи, такие как цепи олигоэтиленгликоля.

Циклодекстрины являются циклическими полисахаридами, содержащими звенья природной D-(+)-глюкопиранозы в α -(1,4) положении. Наиболее распространённые циклодекстрины представляют собой альфа- α -циклодекстрины, бета-(β)-циклодекстрины и гамма-(γ)-циклодекстрины, которые содержат, соответственно, шесть, семь и восемь единиц глюкопиранозы. Структурно, циклическая молекула циклодекстрина образует тороидальную структуру, имеющую внутреннюю апомерную или гидрофобную полость, содержащую вторичные гидроксильные группы, расположенные на одной стороне циклодекстринового тора и первичные гидроксильные группы, расположенные на другой. Например, (β)-циклодекстрин схематически представлен следующей структурой:



Сторона, на которой расположены вторичные гидроксильные группы, имеет больший диаметр, чем сторона, на которой расположены первичные гидроксильные группы. Данное изобретение охватывает ковалентные связи с циклодекстриновыми фрагментами на первичных и/или вторичных гидроксильных группах. Гидрофобная природа внутренней полости циклодекстрина позволяет получать комплексы включения хозяин-гость со многими соединениями, например, адамантаном (Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3, J. L. Atwood et al., eds., Pergamon Press (1996); T. Cserhati, Analytical Biochemistry, 225:328-332 (1995); Husain et al., Applied Spectroscopy, 46:652-658 (1992); FR 2 655 169). Методы модификации полимеров описаны в Suh, J. and Noh. Y., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 1327-1330.

Согласно некоторым вариантам данное изобретение предусматривает линейный, водорастворимый, циклодекстринсодержащий полимер, в котором множество биоактивных звеньев ковалентно присоединены к полимеру через фрагменты, которые расщепляются в биологических условиях с высвобождением биоактивных фрагментов, причём введение полимера пациенту приводит к высвобождению биоактивного агента в течение, по меньшей мере, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 24, 36, 48 или даже 72 часов.

В некоторых вариантах данное изобретение предусматривает регулирование скорости высвобождения терапевтического агента введением различных связующих групп между терапевтическим агентом и/или целевым лигандом и полимером. Так, согласно некоторым вариантам полимерные терапевтические агенты по изобретению являются композициями для регулируемой доставки терапевтических агентов.

Специалисту ясно, что путём метки терапевтического агента и/или целевого лиганда радиометкой или путём образования комплексов ЯМР-активного ядра, например, технеция, гадолиния или диспрозия, можно получить полимеры по изобретению с двойным диагностическим/ терапевтическим действием.

Согласно другим вариантам полимерные соединения стабилизируют биоактивную форму терапевтического агента, которая существует в равновесии между активной и неактивной формами. Например, присоединение терапевтического агента к полимерам по изобретению может сдвинуть равновесие между двумя таутомерными формами агента в сторону биоактивного таутомера. В других вариантах полимерные соединения могут поддерживать равновесие между лактонной и кислой формами терапевтического агента.

Одним из методов определения молекулярного веса является гельпроникающая хроматография («GPC»), например, с колонками со смешанным слоем, растворителем CH_2Cl_2 , детектором светорассеяния и dn/dc . Другие методы известны из уровня техники.

В других вариантах полимерный конъюгат по изобретению может быть гибким или текучим материалом. Когда используемый полимер сам по себе является текучим, полимерная композиция по изобретению, даже когда она является вязкой, не нуждается во включении биосовместимого растворителя, чтобы быть текучей, хотя следы или остаточные количества биосовместимых растворителей всё ещё могут содержаться.

Хотя можно растворять биоразлагаемый полимер или биологически активный агент в небольшом количестве растворителя, который нетоксичен, для более эффективного распределения аморфного монолита или получения тонкой дисперсии биоактивного агента в гибкой или текучей композиции, преимущество данного изобретения заключается в том, что согласно предпочтительному варианту для получения текучей композиции растворитель не нужен. Более того, предпочтительно избегать применения растворителей, так как, как только полимерную композицию, содержащую растворитель, помещают полностью или частично в организм пациента, растворитель выделяется или диффундирует из полимера и должен быть удалён из организма, что вызывает дополнительную тяжесть для организма в смысле его очистки, когда болезнь (и/или другие виды лечения болезни) уже могли отрицательно на него подействовать.

Однако, когда для облегчения смешения или для поддержания текучести полимерного конъюгата по изобретению используется растворитель, он должен быть не токсичным и биосовместимым и должен применяться в сравнительно небольших количествах. Растворители, являющиеся токсичными, не должны использоваться ни в одном материале, который помещается хотя бы частично, в живой организм. Такой

растворитель также не должен вызывать значительного раздражения тканей или некроза в месте введения.

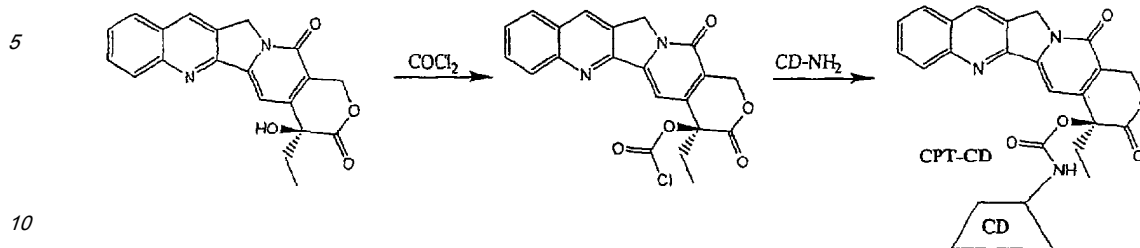
Примеры подходящих биосовместимых растворителей, когда они используются, включают N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, этанол, пропиленгликоль, ацетон, метилацетат, этилацетат, метилэтилкетон, диметилформамид, диметилсульфоксид, тетрагидрофуран, капролактан, олеиновую кислоту или 1-додецилазациклогептанон. Предпочтительные растворители включают N-метил-пирролидон, 2-пирролидон, диметилсульфоксид и ацетон благодаря их сольватирующей способности и их биосовместимости.

В некоторых вариантах полимерные конъюгаты растворяются в одном или нескольких обычных органических растворителях, что облегчает их изготовление и обработку. Обычные органические растворители включают такие, как хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан, 2-бутанон, бутилацетат, этилбутират, ацетон, этилацетат, диметилацетамид, N-метилпирролидон, диметилформамид и диметилсульфоксид.

Один аспект данного изобретения относится к присоединению гидрофобного терапевтического агента, такого как (S)-20-камптотецин, к линейному или разветвлённому циклодекстринсодержащему полимеру для более эффективной доставки лекарства. (S)-20-камптотецин (CPT), алкалоид, выделенный из *Camptithea acuminata* в конце 50-х годов 20 века, проявляет, как было установлено, противораковую активность, ингибируя действие топоизомеразы I во время S-фазы клеточного цикла. Однако, его применение при лечении рака у человека ограничено благодаря нескольким факторам, особенно, его нежелательному взаимодействию с альбумином сыворотки человека, нестабильности биоактивной лактонной формы и плохой растворимости в воде. Для преодоления этой проблемы были получены многие аналоги CPT с улучшенной стабильностью лактонной формы и растворимостью в воде, Топотекан и иринотекан являются аналогами CPT, которые уже были одобрены FDA для лечения рака у людей. Данное изобретение предусматривает различные типы линейных, разветвлённых или привитых циклодекстринсодержащих полимеров, в которых (S)-20-камптотецин ковалентно связан с полимером. Согласно некоторым вариантам лекарство ковалентно связано через биогидролизуемую связь, выбранную из сложноэфирной, амидной, карбаматной или карбонатной связей.

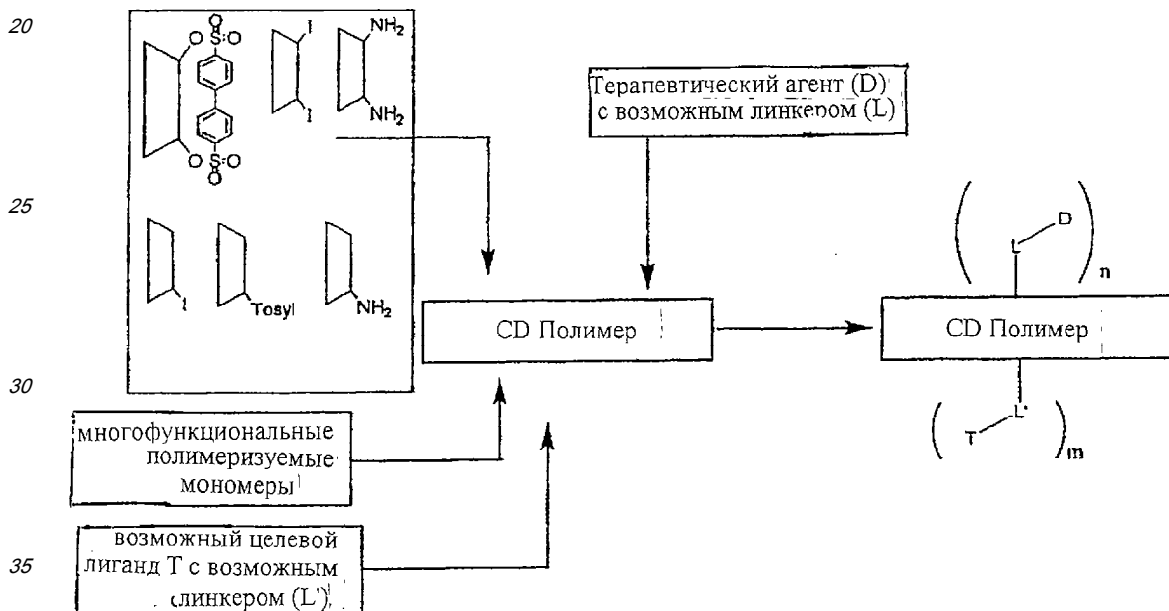
Пример схемы синтеза ковалентно связанного дериватизованного CD с 20(S)-камптотецином приведён на Схеме I.

Схема I:



Не ограничивая объём изобретения заявитель предлагает общую стратегию синтеза линейных, разветвлённых или привитых циклодекстринодержащих полимеров (CD Полимер) для связывания терапевтического агента, такого как камптотecin, и возможного целевого лиганда, показанную на Схеме II.

Схема II:



Далее на Схемах Па–Пб, без ограничения объёма притязаний, показаны предшественники сомономера А, циклодекстриновые фрагменты, терапевтические агенты и/или целевые лиганды, которые могут быть введены в полимер. Следует иметь в виду, что на Схемах Па–Пб в случае любой данной реакции могут быть использованы более, чем один предшественник сомономера А, циклодекстриновый фрагмент, терапевтический агент или целевой лиганд того же типа или разные. Далее, до полимеризации на одной или нескольких отдельных стадиях один или несколько предшественников сомономера А, циклодекстриновых фрагментов, терапевтических агентов или целевых лигандов могут быть ковалентно соединены друг с другом.

Схема IIa: Общая схема для привитых полимеров. Предшественник сомономера А, циклодекстрин, терапевтический агент и целевой лиганд – такие, как описаны выше. Более того, специалист может выбрать различные реакционноспособные группы, например гидроксильные, карбоксильные, галоиды, аминогруппы и активированные этены, этины или ароматические группы, при осуществлении полимеризации. Другие примеры реакционноспособных групп описаны в Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 5th Edition, 2000.

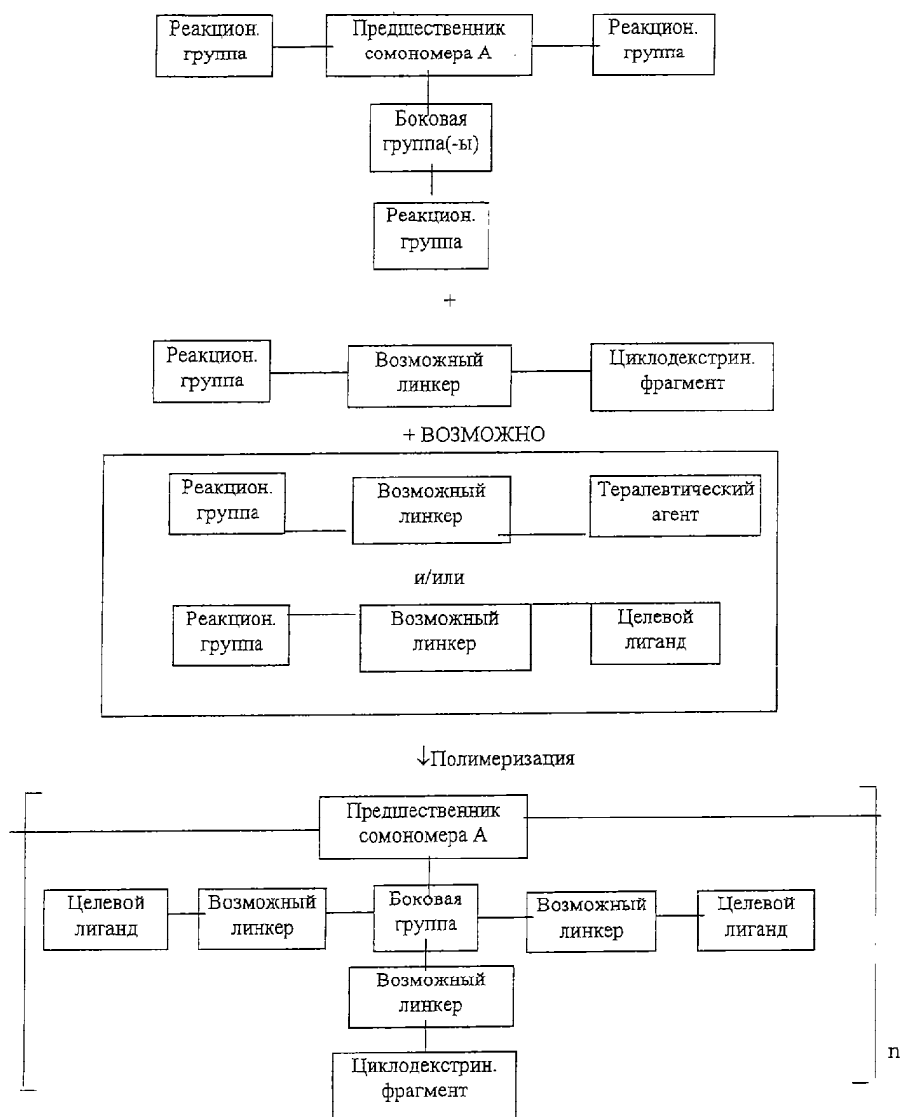


Схема Пб: Общая схема получения линейных циклодекстринсодержащих полимеров.

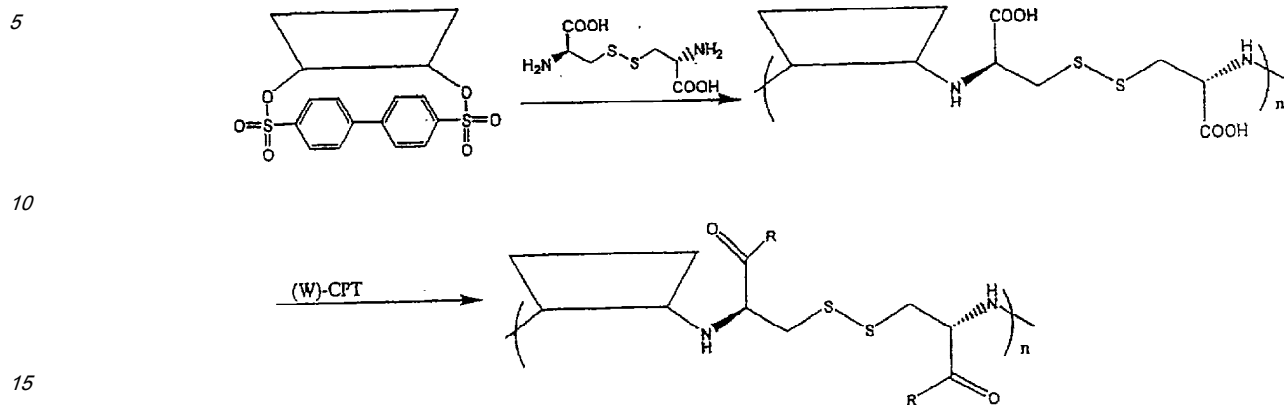
Специалисту очевидно, что путём выбора предшественника сомономера А, содержащего множество реакционноспособных групп, можно получить разветвлённый полимер.



где R является терапевтическим агентом и/или целевым лигандом, который может отсутствовать или содержаться.

Примеры различных способов синтеза линейных полимеров циклодекстрин-СРТ показаны на Схемах III - VIII.

Схема III

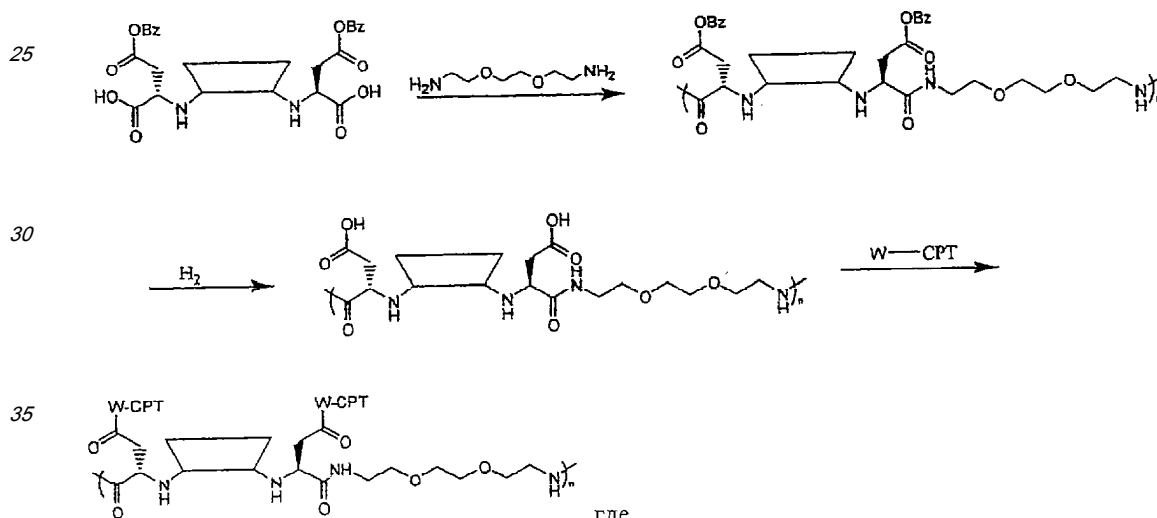


где

W обозначает возможную связующую группу и

R обозначает W-CPT или 0

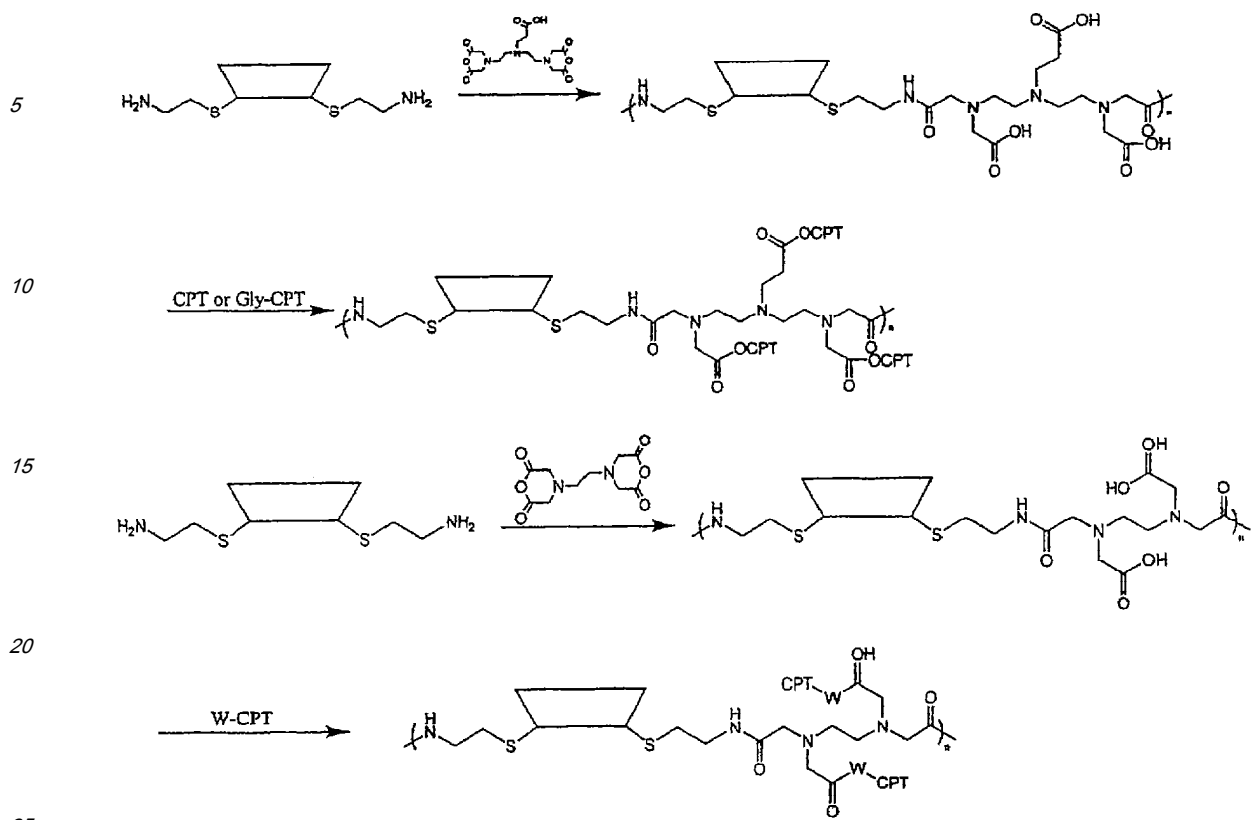
Схема IV



где

W обозначает возможный линкер

Схема V



где

W обозначает возможный линкер, например, остаток глицила

Схема VI

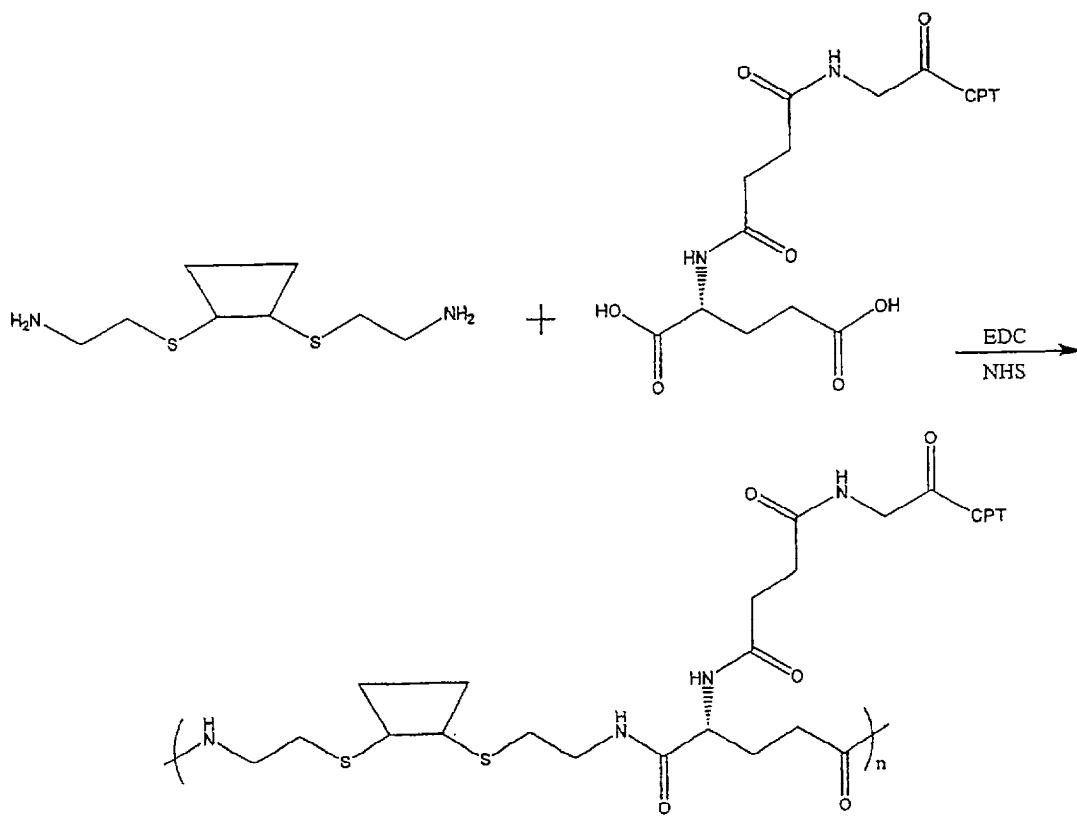


Схема VII

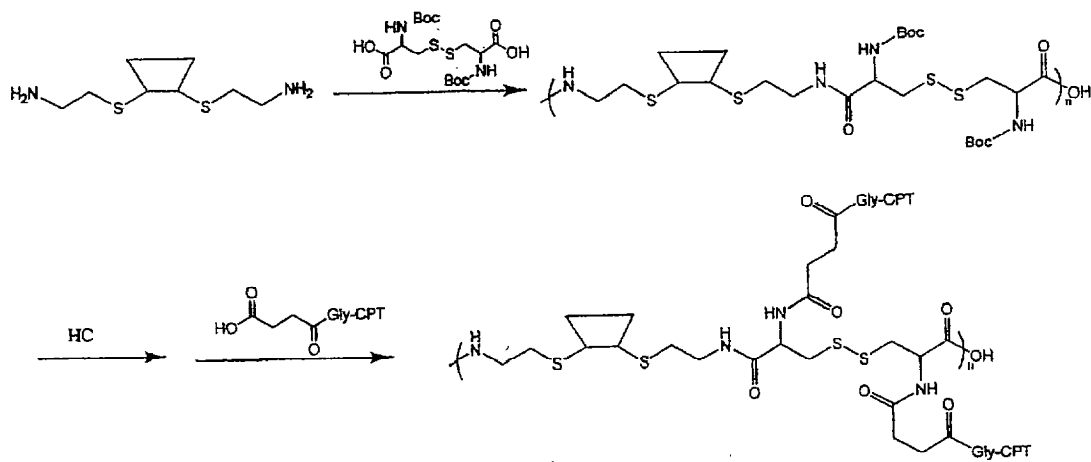
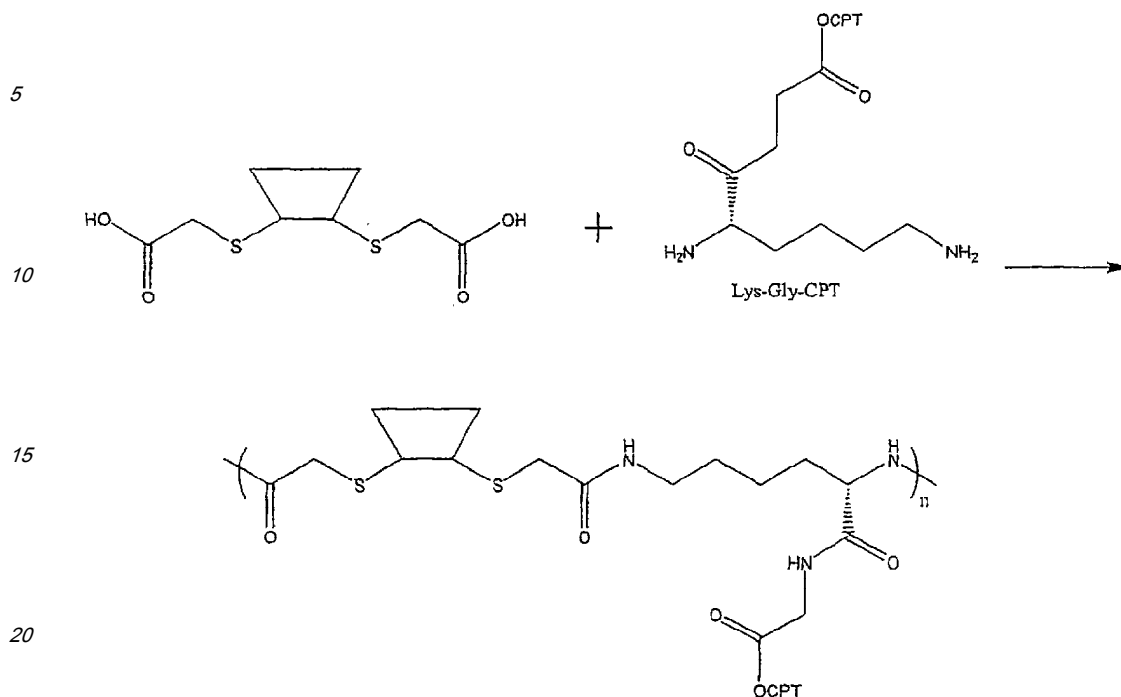


Схема VIII



Примеры прививки циклодекстринов к боковым цепям CPT-содержащих
 25 полимеров показаны на Схемах IX - XII. Каждое звено может повторяться любое число
 раз, и одно звено может повторяться с той же частотой, более часто или менее часто, чем
 другое звено, так что оба звена могут содержаться в примерно одинаковом количестве
 30 или в разных количествах, которые могут слегка отличаться или сильно отличаться,
 например, может содержаться практически одно звено.

В некоторых случаях полимеры являются статистическими, в которых разные
 35 звенья и/или другие мономерные единицы распределены статистически вдоль
 полимерной цепи. Так, в случае формулы $X_m-Y_n-Z_0$, где X, Y и Z являются полимерными
 звеньями, эти звенья могут быть статистически распределены вдоль полимерной цепи. В
 частности, термин «статистический» относится к ситуации, когда конкретное
 40 распределение или введение мономерных звеньев в полимер, имеющий более одного
 типа мономерных звеньев, не управляется или не регулируется непосредственно
 протоколом синтеза, а вместо этого получается в зависимости от признаков, присущих
 45 полимерной системе, таких как реакционная способность, количество звеньев и другие
 характеристики реакции или другие способы изготовления, обработки или лечения.

50

Схема IX.

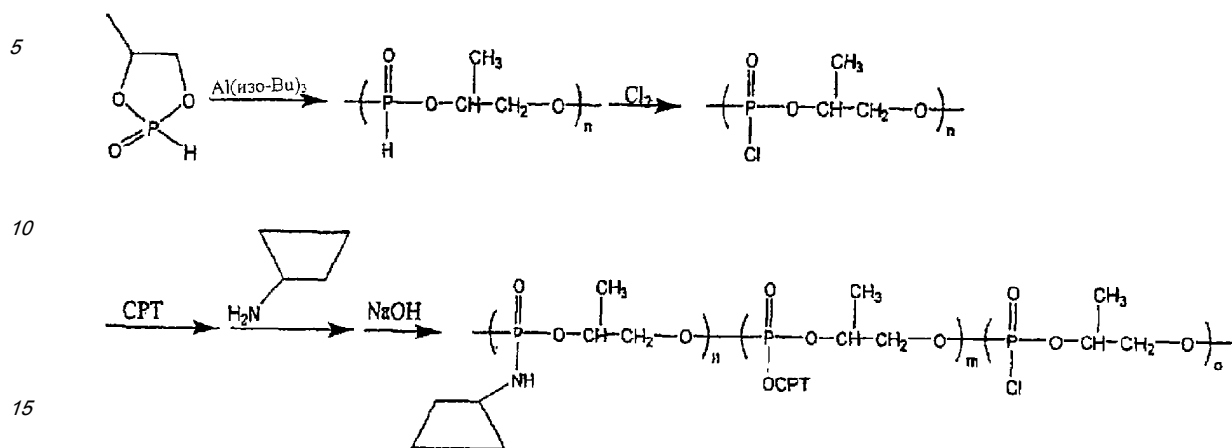


Схема X.

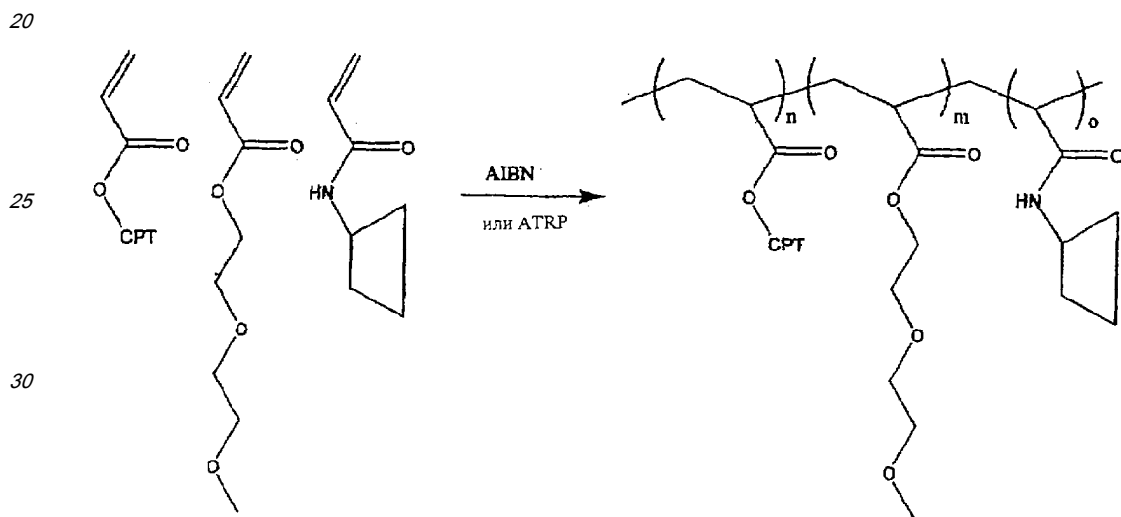


Схема XI.

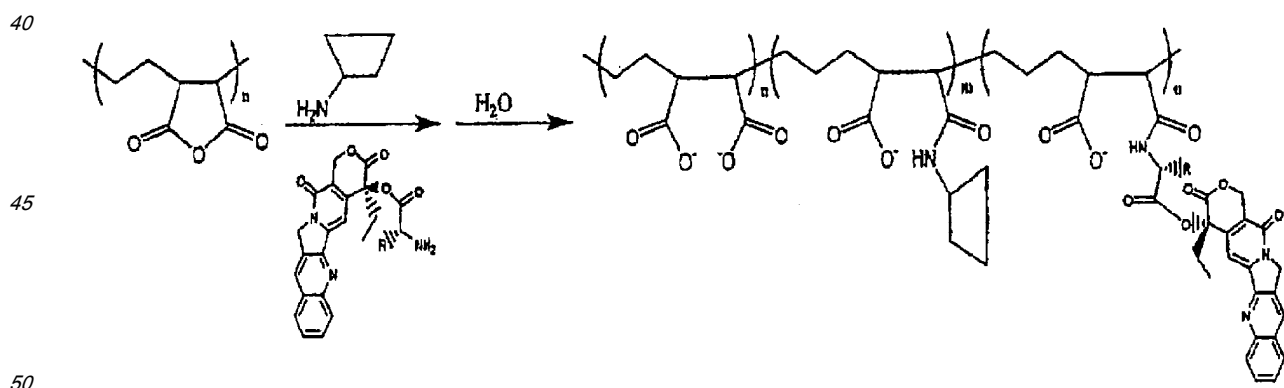


Схема XII.

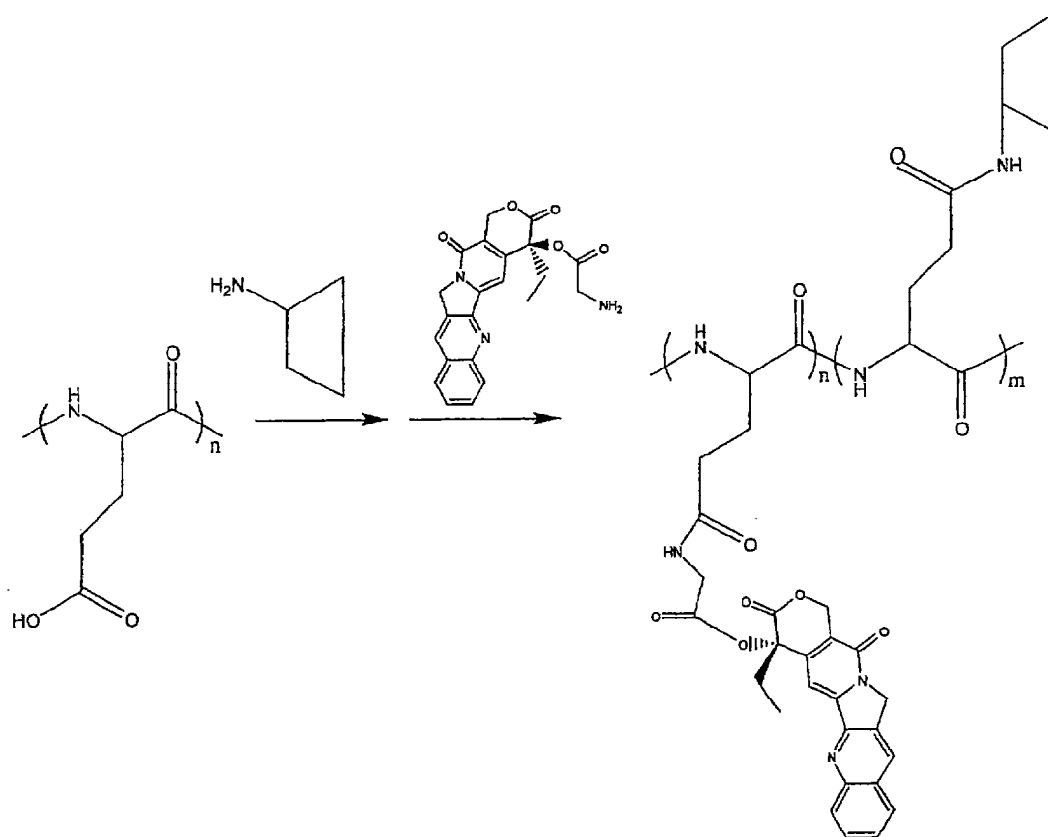
5

10

15

20

25



30

Данное изобретение далее относится к CD-полимерам, полученным с применением CD-бисцистеинового мономера и ди-NHS сложного эфира, такого как PEG-DiSPA или PEG-BTC, как показано на Схемах XIII-XIV.

Схема XIII

35

40

45

50

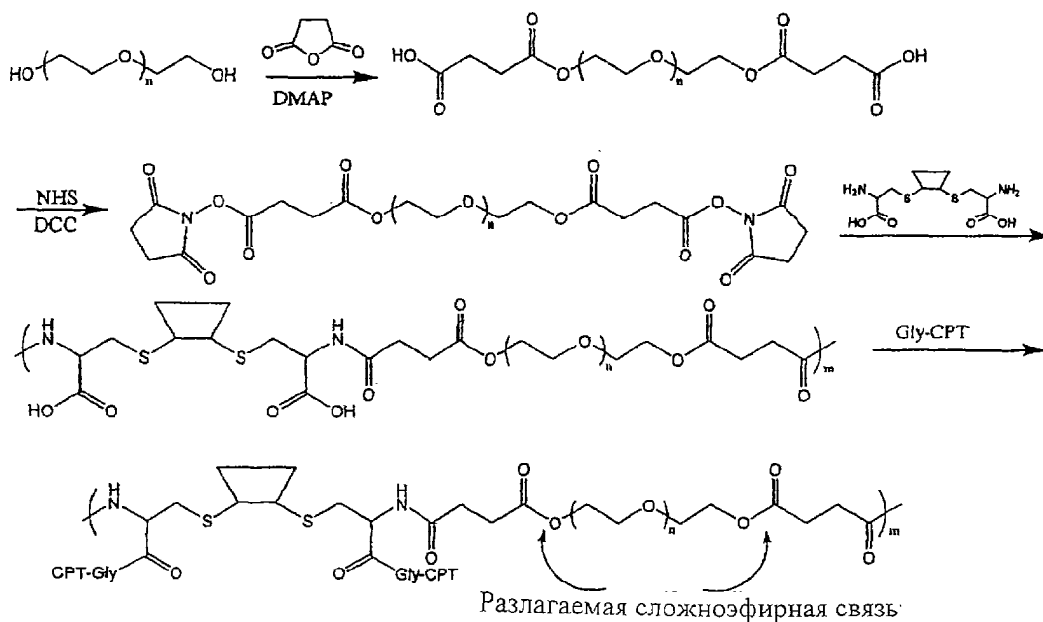
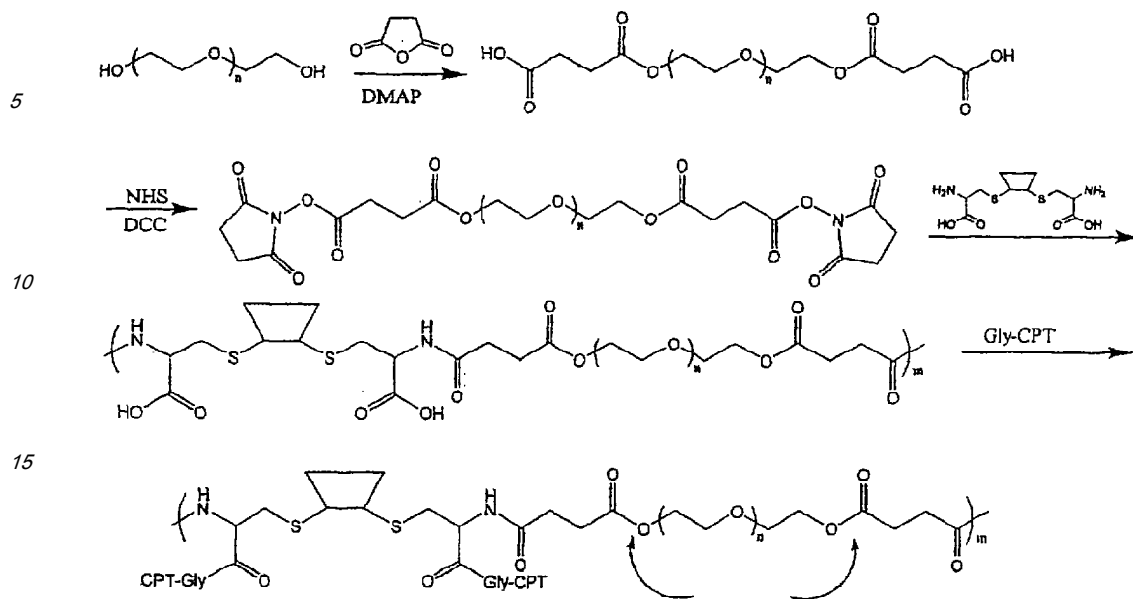


Схема XIV.



Согласно некоторым вариантам настоящее изобретение предусматривает несколько стратегий увеличения содержания лекарства, как показано на Фиг. 1.

(b). Целевой лиганд.

Как указано выше, один аспект настоящего изобретения относится к присоединению терапевтического агента к описанным конъюгатам.

Согласно некоторым вариантам полимерный конъюгат содержит целевой лиганд. Таким образом, в некоторых вариантах изобретения рецептор, клетка и/или лиганд, направленных на определённую ткань, или его предшественник, сочетаются с полимерным конъюгатом. Используемый здесь термин «целевой лиганд» относится к любому материалу или веществу, которые могут промотировать таргетинг рецепторов, клеток и/или тканей *in vivo* или *in vitro* с помощью композиций по изобретению. Целевой лиганд может быть синтетическим, полусинтетическим или природным. Материалы или вещества, которые могут служить целевыми лигандами, включают, например, белки, включая антитела, фрагменты антител, гормоны, аналоги гормонов, гликопротеины и лектины, пептиды, полипептиды, аминокислоты, сахара, сахариды, включая моносахариды и полисахариды, карбогидраты, маленькие молекулы, витамины, стероиды, аналоги стероидов, гормоны, кофакторы, биоактивные агенты и генетический материал, включая нуклеозиды, нуклеотиды, конструкции нуклеиновых кислот и

полинуклеотиды. Используемый термин «предшественник» целевого лиганда относится к любому материалу или веществу, которое может быть превращено в целевой лиганд. Такое превращение может включать, например, прикрепление предшественника к целевому лиганду. Примеры предшественников включают малеимидные группы, дисульфидные группы, такие как орто-пиридилдисульфид, винилсульфоновые группы, азидные группы и α -иодацетильные группы. Присоединение целевого лиганда или его предшественника к полимеру можно осуществлять разными способами, включая, но не ограничиваясь этим, хелатирование, ковалентное присоединение или образование комплексов хозяин – гость. В некоторых вариантах между целевым лигандом или его предшественником и полимером может находиться возможный линкер, причём линкерная группа присоединена к полимеру путём хелатирования, ковалентного присоединения или образования комплексов хозяин – гость. Например, один конец линкерной группы может быть присоединён к целевому лиганду, а другой – к адамантановой группе или другому такому гидрофобному фрагменту, который образует комплекс хозяин – гость с циклодекстриновым звеном. Таким образом, целевой лиганд может быть присоединён к привитому циклодекстриновому звену, к циклодекстриновому звену в полимерной цепи или к самой полимерной цепи. Количество целевых лигандов, приходящееся на полимерную цепь, может меняться в соответствии с различными факторами, включая, но не ограничиваясь этим, идентичность терапевтического агента, природу болезни, тип полимерной цепи. Структуры возможных линкерных групп являются такими же, как у линкерных групп, описанных в других местах данного описания.

(б). Фармацевтические композиции, составы и дозы.

Частично композиция на основе биосовместимого полимера по изобретению включает биосовместимый и, возможно, биоразлагаемый полимер, например, имеющий повторяющиеся мономерные звенья, показанные на одной из вышеприведённых формул, возможно включая любой другой биосовместимый и, возможно, биоразлагаемый полимер, описанный ранее или известный из уровня техники. Согласно некоторым вариантам эти композиции не являются пирогенными, например, не вызывают повышения температуры тела пациента более, чем на клинически приемлемую величину. Композиции по изобретению могут включать «лекарство», «терапевтический агент», «препарат» или «биоактивное вещество», которые являются биологически,

физиологически или фармакологически активными веществами, действующими локально или системно в организме человека или животного. Например, такая композиция может включать любое из других соединений, обсуждавшихся выше.

Могут использоваться различные формы препаратов или биологически активных материалов, которые способны высвободиться из полимерной матрицы в прилегающие ткани или жидкости. Они могут быть гидрофобными молекулами, нейтральными молекулами, полярными молекулами или молекулярными комплексами, способными к связыванию водорода. Они могут быть в виде простых эфиров, сложных эфиров, амидов и т.п., включая пролекарства, которые биологически активируются после инъекции человеку или животному, например путём расщепления сложного эфира или амида. В зависимости от цели терапевтический агент в композиции по изобретению может быть различным.

В полимеры по изобретению могут быть введены известные пластификаторы и стабилизаторы. В некоторых случаях добавки, такие как пластификаторы и стабилизаторы, подбираются по их биосовместимости. В некоторых вариантах эти добавки являются поверхностно-активными для лёгких, например, 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и L- α -фосфатидилхолин (PC).

Композиция по изобретению может также содержать один или несколько адъювантов, таких как наполнители, загустители и т.п. В других вариантах материалы, служащие адъювантами, могут ассоциироваться с полимерной матрицей. Такие добавки могут влиять на характеристики получающейся полимерной матрицы.

Например, наполнители, такие как альбумин бычьей сыворотки (BSA) или альбумин сыворотки мыши, может ассоциироваться с полимерной матрицей. В некоторых вариантах количество наполнителя может колебаться от примерно 0,1 до примерно 50% и более от веса полимерной матрицы или примерно 2,5, 5, 10, 25 или 40%. Введение таких наполнителей может влиять на биоразложение полимерного материала и/или скорость пролонгированного высвобождения любого инкапсулированного вещества. В некоторых вариантах данного изобретения могут быть использованы другие известные специалисту наполнители, такие как углеводы, сахара, крахмалы, сахараиды, целлюлозы и полисахариды, включая маннитофу и сахарозу.

В других вариантах получения полимерных матриц по изобретению, которые обычно имеют сферическую форму, облегчают усилители сферонизации. Такие вещества, как цетин, микрокристаллическая целлюлоза или микрокристаллическая целлюлоза, полученная совместно с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы, могут придавать

пластичность композициям по изобретению, а также прочность и целостность. Согласно другим вариантам во время сферонизации экструдаты, которые являются жёсткими, но не пластичными, приводят к образованию имплантов гиреобразной формы и/или большого количества мелких частиц, и экструдаты, которые являются пластичными, но не жёсткими, имеют тенденцию к агломерации и образуют чрезвычайно большие импланты. В таких вариантах желателен баланс между жёсткостью и пластичностью. Количество усилителя сферонизации в составе обычно составляет 10-90% (вес/вес).

В некоторых вариантах композиция по изобретению включает эксципиент. Конкретный эксципиент может быть выбран на основе его точки плавления, растворимости в выбранном растворителе (например, растворителе, который растворяет полимер и/или терапевтический агент) и полученных характеристик микрочастиц.

Эксципиенты могут составлять несколько процентов, примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% или более от веса композиций.

В композиции по изобретению для регулирования их pH могут быть введены буферы, кислоты и основания. Могут быть также включены агенты для увеличения диффузионного расстояния агентов, высвобождающихся из полимерной матрицы.

Дезинтегранты являются веществами, которые в присутствии жидкости ускоряют разрушение композиций. Дезинтегранты чаще всего используются в имплантах, в которых функция дезинтегранта состоит в противодействии и нейтрализации эффекта любых связующих, используемых в составе по изобретению. В общем, механизм дезинтеграции включает абсорбцию влаги и набухание нерастворимого материала.

Примеры дезинтегрантов включают натриевую соль кроскармеллозы и кросповидон, которые в некоторых вариантах могут быть введены в полимерные матрицы в количестве примерно 1-20% от общего веса матрицы. В других случаях для облегчения дезинтеграции имплантов могут быть также добавлены растворимые наполнители, такие как сахара (маннит и лактоза).

Для ускорения или регулирования желательной скорости высвобождения терапевтического агента согласно конкретному протоколу лечения могут быть использованы другие материалы. Например, если пролонгированное высвобождение является слишком медленным для конкретного применения, для образования дополнительных пар в матрице может быть добавлен порообразующий агент. В качестве порообразующего агента может быть использован любой биосовместимый водорастворимый материал. Они могут быть способны растворяться, диффундировать или диспергироваться из образовавшейся полимерной системы, когда в системе

генерируются поры и микропористые каналы. Количество порообразующего агента (и размер дисперсных частиц такого порообразующего агента, если он применяется) в композиции будет влиять на размер и количество пор в полимерной системе.

Порообразующие агенты включают любое фармацевтически приемлемое органическое или неорганическое вещество, которое смешивается с водой и с жидкостями, находящимися в организме, и рассеивается из образующейся и образовавшейся матрицы в водную среду и физиологические жидкости или же которое не смешивается с водой и быстро распадается на водорастворимые вещества.

Подходящие порообразующие агенты включают, например, сахара, такие как сахароза и декстроза, соли, такие как хлористый натрий, углекислый натрий, и полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль и ПВП. Размер и степень распространения пор могут колебаться в широких пределах при изменении молекулярного веса и количества порообразующего агента, введенного в полимерную систему.

Заряд, липофильность или гидрофильность любой полимерной матрицы по изобретению могут быть модифицированы путём прикрепления соответствующего соединения к поверхности матрицы. Например, для улучшения смачиваемости плохо растворимых или гидрофобных композиций могут быть использованы поверхностно-активные вещества. Примеры подходящих поверхностно-активных веществ включают декстран, полисорбаты и лаурилсульфат натрия. В общем, поверхностно-активные вещества используются в небольших концентрациях, обычно менее примерно 5%.

Связующие являются адгезионными материалами, которые могут быть введены в полимерные составы для связывания и поддержания целостности матрицы. Связующие могут добавляться в виде сухого порошка или раствора. В качестве связующих могут действовать сахара и при родные и синтетические полимеры.

Вещества, добавляемые именно в качестве связующих, обычно вводятся в пределах от примерно 0,5% до 15% от веса матрицы. Некоторые вещества, такие как микрокристаллическая целлюлоза, используемая также как усилитель сферонизации, обладает также связующими свойствами.

Для модификации свойств матрицы могут наноситься различные покрытия.

Тремя примерами различных типов покрытий являются герметизирующее, гляцевое покрытие и энтеропокрытие. Другие типы покрытий, обладающие различной растворимостью или эрозионными свойствами, могут быть использованы для дальнейшей модификации свойств матриц, и такие покрытия известны специалисту.

Герметизирующее покрытие может предотвращать излишнее поглощение влаги матрицами во время нанесения водных энтеропокрытий. Глянцевое покрытие обычно улучшает использование готовых матриц. Для герметизирующего и глянцевого покрытия имплантов можно использовать водорастворимые вещества, такие как гидроксипропилцеллюлоза. Герметизирующее покрытие и глянцевое покрытие обычно наносятся на матрицы распылением до увеличения веса от примерно 0,5% до примерно 5%, часто до примерно 1% для герметизирующего покрытия и до примерно 3% для глянцевого покрытия.

Энтеропокрытия выполняют из полимеров, которые являются нерастворимыми при низком pH (менее 3,0) в желудке, но растворяются при повышенном pH (более 4,0) в тонкой кишке. Такие полимеры, как EUDRAGIT™, RohmTech, Inc., Malden, Mass., и AQUATERIC™, FMC Corp., Philadelphia, Penn., могут использоваться и наноситься в виде тонких мембран на импланты из водного раствора или суспензии или распылением и сушкой. Энтеропокрытие обычно наносится распылением до увеличения веса от примерно 1% до примерно 30%, предпочтительно, от примерно 10% до примерно 15%, оно может включать различные адъюванты, такие как пластификаторы, поверхностно-активные вещества, разделительные агенты, которые снижают клейкость имплантов во время нанесения покрытия, и вещества, регулирующие проницаемость покрытий.

Композиции по изобретению могут дополнительно содержать одну или несколько добавок, таких как волокнистые наполнители, красители, отдушки, модифицирующие каучуки, модифицирующие агенты и т.д. На практике каждая из этих возможных добавок должна быть совместима с образующим полимером и годиться для предполагаемого применения. Примеры подходящих волокнистых наполнителей включают микрофибриллы PGA, микрофибриллы коллагена, микрофибриллы целлюлозы и полиолефинов. Количество каждой из этих возможных добавок, используемых в композиции, должно быть таким, чтобы обеспечить желательный эффект.

Терапевтические полимерные конъюгаты, описанные в данной заявке, могут быть введены в различных фармацевтических препаратах в зависимости от вида болезни и возраста больного, состояния и веса пациента, что хорошо известно из уровня техники. Например, когда соединения должны вводиться перорально, они могут быть в виде таблеток, капсул, гранул, порошков или сиропов; в случае парентерального введения они могут быть в виде растворов для инъекций (внутривенных, внутримышечных или подкожных), препаратов в виде капель для инфузии или свечей. В случае офтальмологического применения для слизистой мембраны они могут быть в виде

глазных капель или глазных мазей. Эти препараты могут быть получены обычными способами и, если желательно, активный ингредиент может быть смешан с любой
5 обычной добавкой, такой как эксципиент, связующее, дезинтегрант, смазывающий агент, корригент, солюбилизующий агент, суспензионная добавка, эмульгатор или агент для получения покрытий. Хотя дозировка зависит от симптомов, возраста и веса пациента, природы и сложности заболевания, подвергающегося лечению или профилактике, метода
10 введения и формы лекарства, дневная доза от 0,01 до 2000 мг терапевтического агента рекомендуется для взрослого пациента, она может вводиться в виде одной дозы или нескольких доз.

15 Точное время введения и/или количество терапевтического полимерного конъюгата, которые обеспечивают наиболее эффективные результаты для данного пациента, зависят от активности, фармакокинетики и биодоступности конкретного
20 соединения, физиологического состояния пациента (включая возраст, пол, тип болезни и её стадию, общее физическое состояние, восприимчивость к данной дозе и типу медикамента), метода введения и т.д. Однако вышеприведённые инструкции можно
25 использовать как основу для выбора метода лечения, например, определения оптимального времени и/или количества вводимого вещества, который не требует ничего, кроме рутинных экспериментов, состоящих из мониторинга субъекта и подбора доз и/или
30 времени.

Выражение «фармацевтически приемлемый» относится к тем терапевтическим полимерным конъюгатам, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые с точки зрения здравого смысла в медицине, подходят для применения для
35 контакта с тканями людей и животных при отсутствии избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений и разумном отношении положительный результат/риск.

40 Выражение «фармацевтически приемлемый носитель» обозначает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твёрдый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий
45 материал, участвующий в переносе или транспортировке субъекту химического вещества от одного органа или части тела к другому органу или другой части тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле его совместимости с другими ингредиентами состава и безвредности для пациента. Некоторые примеры веществ,
50 которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями включают: (1) сахара, такие как лактозу, глюкозу и сахарозу; (2) крахмалы, такие как кукурузный

крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и её производные, например, натриевую соль карбоксиметил-целлюлозы, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и суппозиторные воска; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, сезамное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит, полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроокись магния и гидроокись алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) воду, не содержащую пирогенов; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатный буферный раствор и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях.

Выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится к сравнительно нетоксичным солям терапевтического полимерного конъюгата и неорганических и органических кислот. Эти соли могут быть получены *in situ* во время выделения и очистки терапевтических полимерных конъюгатов или путём отдельной реакции очищенного полимера в виде его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и выделения полученной таким образом соли. Примеры солей включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т.п. (см., например, Berge et al. (1997) «Pharmaceutical Salts», J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

В других случаях терапевтические полимерные конъюгаты, используемые в способах по изобретению, могут содержать одну или несколько кислотных функциональных групп и поэтому они способны образовать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми основаниями. В этих случаях выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится к сравнительно нетоксичным солям неорганических и органических оснований и полимера(-ов). Эти соли также могут быть получены *in situ* в процессе выделения и очистки полимера(-ов) или путём отдельной реакции очищенного полимера(-ов) в его свободной кислой форме с подходящим основанием, таким как гидроокись, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Примеры

солей щелочных или щелочноземельных металлов включают литиевые, натриевые, калиевые, кальциевые, магниевые и алюминиевые соли и т.п. Примеры органических аминов, пригодных для получения солей оснований, включают этиламин, диэтиламин, 5 этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (см., например, Berge et al., supra).

В композициях также могут содержаться смачивающие агенты, эмульгаторы и 10 смазочные агенты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, агенты, способствующие высвобождению, подсластители, ароматизаторы и отдушки, противостарители и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфат натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, 20 такие как аскорбилпальмиат, бутилированный гидроксианазол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Составы по данному изобретению включают препараты, подходящие для 25 орального, назального, топического (включая офтальмологическое, ушное, буккальное и подъязычное), ректального, вагинального, аэрозольного и/или парентерального введения. Составы могут быть в виде единичных дозированных форм и могут быть приготовлены 30 любыми методами, хорошо известными в фармацевтике. Количество активного ингредиента, которое может быть соединено с носителем для получения единичной дозированной формы, колеблется в зависимости от организма хозяина, конкретного метода введения. Количество активного ингредиента, которое может быть соединено с 35 носителем для получения единичной дозированной формы, обычно является таким, которое обеспечивает терапевтический эффект. Обычно это количество находится в интервале от примерно 1% до примерно 99%, предпочтительно, от примерно 5% до 40 примерно 70%, наиболее предпочтительно, от примерно 10% до примерно 30%.

Способы получения этих составов или композиций включают стадию соединения 45 терапевтического полимерного конъюгата(-ов) с носителем и, возможно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. В общем, составы приготавливают путём равномерного и тщательного соединения терапевтического полимерного конъюгата с жидкими носителями или мелкоизмельчёнными твёрдыми носителями, или с 50 теми и другими, и затем, если это необходимо, формования продукта.

Составы, пригодные для перорального введения, могут быть в виде капсул, крахмальных облаток, пилюль, таблеток, жевательных резинок, леденцов (на основе ароматизированных веществ, обычно сахарозы и смолы акации или траганта), порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной среде или в виде эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахарозы и смолы акации) и/или в виде растворов для полоскания рта и т.п., причём каждая такая форма содержит заданное количество терапевтического полимерного конъюгата(-ов) в качестве активного ингредиента. Соединение может быть также введено в виде болюса, электуария или пасты.

Таблетку можно изготовить прессованием или формованием, возможно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с применением связующего (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего агента, инертного разбавителя, противостарителя, дезинтегранта (например, натриевой соли гликолята крахмала или сшитой натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть изготовлены путём формования в подходящей машине смеси порошкообразного пептида или пептидомиметика, увлажнённого инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твёрдые дозированные формы, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут быть сделаны шероховатыми или изготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеропокрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтики. Они могут иметь такой состав, чтобы обеспечить медленное или регулируемое высвобождение используемого активного ингредиента за счёт применения, например, гидроксипропилметил-целлюлозы в различных количествах для получения желательного профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Они могут быть стерилизованы, например, путём фильтрования через фильтр, задерживающий бактерии, путём введения стерилизующих агентов в виде стерильных твёрдых композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде или некоторых других стерильных инъектируемых средах непосредственно перед применением. Эти композиции также могут содержать матирующие агенты и могут иметь такой состав, что они высвобождают активный ингредиент(-ы) только, или предпочтительно в определённой части желудочно-кишечного тракта, возможно, отсроченно. Примеры таких композиций, которые могут быть использованы, включают

полимерные вещества и воски. Активный ингредиент может быть также, если это желательно, в микроинкапсулированном виде вместе с одним или несколькими вышеописанными эксципиентами.

5 Жидкие дозированные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В добавление к активному ингредиенту жидкие дозированные формы могут
10 содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый
15 спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло из ростков, оливковое, касторовое и сезамное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры жирных
20 кислот сорбитана и их смеси.

Кроме инертных разбавителей оральные композиции могут также включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергаторы, подсластители,
25 ароматизаторы, красители, отдушки и противостарители.

Суспензии, в добавление к активным терапевтическим полимерным конъюгатам, могут содержать суспендирующие агенты, как, например, этоксилированные
30 изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид альбумина, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Составы для ректального или вагинального введения могут быть в виде
35 суппозитория, который может быть изготовлен путём смешения одного или нескольких терапевтических полимерных конъюгатов с одним или несколькими подходящими, не вызывающими раздражения эксципиентами или носителями, содержащими, например,
40 масло какао, полиэтиленгликоль, суппозиторный воск или салицилат, и который является твёрдым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела, и, следовательно, будет плавиться в заднем проходе или вагинальной полости и высвобождать активный
45 агент.

Составы для вагинального введения могут быть также в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен и лаков, содержащих известные из уровня техники носители.

Дозированные формы для топического или трансдермального введения
50 терапевтического полимерного конъюгата(-ов) включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингалируемые составы. Активный

компонент может быть смешан в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми противостарителями, буферами или пропеллентами, если они требуются.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать в добавление к лиганду(-ам), эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масло, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и окись цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать в добавление к терапевтическому полимерному конъюгату(-ам) эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремневая кислота, гидроокись алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида или их смеси. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды, летучие незамещённые углеводороды, такие как бутан и пропан.

Терапевтический полимерный конъюгат(-ы) может быть альтернативно введён в виде аэрозоля. Это осуществляется путём изготовления водного аэрозоля, липосомального препарата или твёрдых частиц, содержащих соединение. Можно использовать неводные (например, с фторуглеводородным пропеллентом) суспензии. Предпочтительны акустические распылители, потому что они сводят к минимуму возможность сдвига агента, которое может привести к разложению соединения.

Обычно водный аэрозоль получают изготовлением водного раствора или суспензии агента вместе с обычно применяемыми фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы могут меняться в зависимости от требований конкретного соединения, но обычно включают неионные поверхностно-активные вещества (Tweens, Pluronic или полиэтиленгликоль), белки, такие как альбумин сыворотки, эфиры сорбитана, олеиновую кислоту, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахарные спирты. Аэрозоли обычно готовят из изотонических растворов.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в том, что они обеспечивают регулирующую доставку терапевтического полимерного конъюгата(-ов) в организм. Такие дозированные формы могут быть получены путём растворения или диспергирования агента в подходящей среде. Ускорители абсорбции могут быть использованы для увеличения количества лиганда, проходящего через кожу. Скорость такого проникновения может регулироваться или мембраной, обеспечивающей регулирование скорости, или путём диспергирования пептидомиметика в полимерной матрице или геле.

Офтальмологические составы, глазные мази, порошки, растворы и т.п. также входят в объём данного изобретения.

5 Фармацевтические композиции по изобретению, подходящие для парентерального введения, содержат один или несколько терапевтических полимерных конъюгатов в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или 10 эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть воссозданы в стерильные инъеклируемые растворы или дисперсии перед применением, они могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики, растворённые вещества, которые делают состав изотоническим с кровью реципиента, или суспендирующие или загущающие 15 агенты.

Примеры подходящих водных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их смеси, растительные 20 масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Можно поддерживать подходящую текучесть, например, путём использования материалов покрытий, например лецитина, путём поддержания требуемого размера 25 частиц в случае дисперсий и путём применения поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать адъюванты, такие как противостарители, 30 смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергаторы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой 35 кислоты и т.п. Можно включать в состав изотонические агенты, такие как сахара, хлористый натрий и т.п. В добавление, пролонгированная абсорбция инъеклируемой фармацевтической формы может быть достигнута путём включения агентов, которые 40 замедляют абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых случаях для пролонгирования действия лекарства желательно замедлить абсорбцию лекарства при подкожной или внутримышечной инъекции. Этого 45 можно достигнуть при использовании жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества с плохой растворимостью в воде. Тогда скорость абсорбции лекарства зависит от скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и их формы. Иначе, отсроченная абсорбция введённого 50 парентерально лекарства достигается путём растворения или суспендирования лекарства в масляном носителе.

Инъецируемые депо-формы изготавливают путём получения матриц-микрокапсул терапевтического полимерного конъюгата(-ов) в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения лекарства к полимеру и природы используемого полимера можно регулировать скорость высвобождения лекарства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(орто-эфиры) и полиангидриды. Инъецируемые депо можно также получить путём помещения лекарства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями тела.

Когда терапевтический полимерный конъюгат(-ы) по изобретению используется как фармацевтическое вещество для людей и животных, он может вводиться сам по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, 0,1 -99,5% (более предпочтительно 0,5-90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Препараты этих агентов могут вводиться перорально, парентерально, топически или ректально. Конечно, их вводят в виде форм, подходящих для каждого метода введения. Например, они вводятся в виде таблеток или капсул, путём инъекции, ингаляции, в виде глазного лосьона, мази, суппозитория, путём инфузии; топическим путём в виде лосьона или мази и ректально в виде свеч. Предпочтительным является пероральное введение.

Выражения «парентеральное введение» и «введённый парентерально», используемые в данной заявке, обозначают методы введения, не являющиеся энтеральными или топическими, обычно это метод инъекции, он включает, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсульное, интраглазное, внутрисердечное, интрадермальное, интраперитонеальное, чрестрахеальное, подкожное, чрескутикулярное, чрезатикулярное, субарахноидальное, субкапсулярное, внутривerteбальное и внутригрудное введение путём инъекции или инфузии.

Выражение «системное введение» и «введённый системно», «периферическое введение» и «введённый периферически» обозначают введение терапевтического полимерного конъюгата, лекарства или другого материала иначе, чем непосредственно в центральную нервную систему, такое, что этот материал попадает в систему пациента и, таким образом, подвергается метаболизму и другим похожим процессам, например, при подкожном введении.

Эти терапевтические полимерные конъюгаты могут быть введены людям и другим животным для лечения любым подходящим методом, включая оральный, назальный, как,

например, в виде спрея, ректальный, интравагинальный, парентеральный, внутриполостной и топический, например, в виде порошков, мазей или капель, включая трансбуккальный и подъязычный методы.

Независимо от выбранного метода введения, терапевтические полимерные конъюгаты, которые можно применить в подходящей гидратированной форме и/или фармацевтической композиции согласно данному изобретению, перерабатываются в фармацевтически приемлемые дозированные формы обычными способами, известными специалисту.

Действительные дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях по изобретению могут колебаться, при этом нужно получить такое количество активного ингредиента, которое эффективно для получения желательного терапевтического ответа у конкретного пациента, для конкретных композиции и метода введения и при этом нетоксично для пациента.

(в) Физические структуры композиций по изобретению.

Применяемые полимеры могут быть переработаны с получением разных форм. Например, согласно некоторым вариантам полимерные матрицы по изобретению могут быть в виде микрочастиц или наночастиц. Микросферы обычно представляют собой биоразлагаемую полимерную матрицу, включающую лекарство. Микросферы могут быть изготовлены различными методами, известными специалистам. Примеры получения микросфер включают, но не ограничиваются этим, (а) фазовое разделение путём эмульгирования и последующего испарения органического растворителя (включая комплексные эмульсионные методы, такие как получение эмульсий масло-в-воде, вода-в-масле и вода-масло-вода); (б) коацервация – разделение фаз; (в) диспергирование расплава; (г) межфазное отложение; (д) полимеризация *in situ*; (е) сушка распылением и затвердевание лака; (ж) нанесение воздухом покрытия из суспензии и (з) «пан» распыление. Эти методы, как свойства и характеристики микросфер описаны, например, в патентах США 4 652 441, 5 100 669, 4 526 938, заявке WO 93/24150, заявке EP 0258780 A2, патентах США 4 438 253 и 5 330 768, включённых в данную заявку в качестве ссылок. Для изготовления микросфер по изобретению можно использовать несколько методов в зависимости от желаемой области применения этих носителей для доставки. Подходящие методы включают, без ограничения, сушку при распылении, сушку замораживанием,

воздушную сушку, сушку в вакууме, сушку в псевдоожигенном слое, перемальвание, соосаждение и критическую экстракцию жидкости.

В случае сушки распылением, замораживанием, воздушной сушки, сушки в вакууме, сушки в псевдоожигенном слое и критической экстракции жидкости компоненты (стабилизирующий полиол, биоактивное вещество, буферы и т.д.) сначала растворяются или суспендируются в водной среде. В случае перемальвания компоненты смешиваются в сухом виде и размальваются известными методами. В случае соосаждения компоненты смешивают в органической среде и перерабатывают как описано ниже. Сушка при распылении может быть использована для введения стабилизирующего полиола в биоактивный материал. Компоненты смешивают в водной среде и сушат с применением прецизионного сопла для получения чрезвычайно однородных капель в сушильной камере. Подходящие сушильные устройства включают, но не ограничиваются этим, Buchi, NIRO, APV и Lab-plant, используемые в соответствии с инструкциями производителя. Форму микрочастиц и наночастиц можно определить с помощью сканирующей электронной микроскопии. Сферические наночастицы используют для циркуляции в кровеносной системе. Если это желательно, можно известными методами получить частицы другой формы, которые более пригодны для какого-либо применения. В добавление к внутриклеточной доставке терапевтического агента можно также сделать так, чтобы частицы композиций по изобретению, так же как микрочастицы или наночастицы, подвергались эндоцитозу, получая при этом доступ к клетке. Частота такого процесса эндоцитоза, вероятно, будет зависеть от размера любой частицы.

В некоторых вариантах могут быть использованы твёрдые изделия, обеспечивающие жёсткость и структурную прочность полимерных матриц. Например, полимер может быть образован на сите или какой-либо ткани для имплантации. Полимер может быть также сформован в виде стента или шунта, адаптированных для удержания открытых областей в тканях организма или для дренажа жидкости из одной полости в организме или просвета в другие. Далее, полимер может быть изготовлен в виде дренажа или трубки, подходящей для удаления жидкости из послеоперационного участка и согласно некоторым вариантам адаптируемой для использования в закрытой дренажной системе, например, дренажей Jackson-Pratt и т.п., которые известны из уровня техники.

Механические свойства полимера могут быть важными для перерабатываемости при изготовлении формованных или прессованных изделий для имплантации. Например, температура стеклования может колебаться в широких пределах, но должна быть

значительно ниже, чем температура разложения для того, чтобы соответствовать требованиям обычных методов изготовления, таких как компрессионное формование, экструзия или инъекционное формование.

(г) Биоразлагаемость и характеристики высвобождения.

Согласно некоторым вариантам полимеры и смеси согласно данному изобретению при контакте с жидкостями в организме подвергаются постепенному разложению. Жизнеспособность биоразлагаемого полимера *in vivo* зависит, наряду с другими факторами, от его молекулярного веса, кристалличности, биостабильности и степени сшивки. В общем, чем больше молекулярный вес, тем выше степень кристалличности, и чем больше биостабильность, тем медленнее будет происходить биоразложение.

Если композиция по изобретению получена с терапевтическим агентом или другим веществом, высвобождение такого агента и другого материала в течение продолжительного периода обычно происходит сравнимо с высвобождением из изотонического физиологического раствора. Такой профиль высвобождения может привести к пролонгированной доставке (более, чем от 1 до примерно 2000 часов или же от примерно 2 до примерно 800 часов) эффективного количества (например, примерно 0,0001 мг/кг/час – 10 мг/кг/час) агента или любого другого вещества, ассоциированного с полимером.

Многие факторы могут влиять на желательную скорость гидролиза полимеров по изобретению, желаемые мягкость и гибкость получающейся твёрдой матрицы, скорость и степень высвобождения биоактивного материала. Некоторые из таких факторов включают выбор/идентичность различных звеньев, энантиомерную или диастереомерную чистоту мономерных звеньев, гомогеничность звеньев в полимере и длину цепи полимера. Например, данное изобретение охватывает гетерополимеры с различными связями и/или включение других мономерных звеньев в полимер для того, чтобы, например, регулировать скорость биоразложения матрицы.

Далее, следует отметить, что можно получить широкий интервал скоростей разложения, регулируя гидрофобность основных или боковых цепей полимеров, всё ещё поддерживая достаточную биоразлагаемость, нужную для применения любого такого полимера для определённой цели. Такой результат может быть достигнут путём варьирования различных функциональных групп полимера. Например, комбинация

гидрофобной основной цепи и гидрофильной связи приводит к гетерогенному разложению, так как разложение ускоряется, а проникновение воды затруднено.

Один протокол, обычно принятый в этой области, который может быть использован для определения скорости высвобождения любого терапевтического агента или другого материала из полимерных матриц по изобретению, включает разложение любой такой матрицы в 0,1M растворе PBS (pH 7,4) при 37°C, этот анализ известен из уровня техники. Для целей данного изобретения термин «PBS протокол», используемый в данной заявке, относится именно к такому протоколу.

В некоторых случаях скорости высвобождения из различных полимерных систем по изобретению можно сравнить при помощи этого протокола. В некоторых случаях может быть необходимым обрабатывать полимерные системы одним и тем же способом для того, чтобы обеспечить непосредственное и довольно точное сравнение различных систем. Например, данное изобретение предусматривает несколько различных средств для создания полимерных матриц по изобретению. Такое сравнение может показать, что любая одна полимерная система высвобождает материал со скоростью от примерно в 2 или менее до примерно в 1000 или более раз быстрее, чем другая полимерная система.

Альтернативно, сравнение может обнаружить различие в скоростях в примерно 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 750 раз. Настоящее изобретение предусматривает даже большие разницы в скоростях высвобождения.

В некоторых вариантах, в случае особого состава, скорость высвобождения для полимерных систем по изобретению может быть моно- или двухфазная.

Высвобождение любого материала, введенного в полимерную матрицу, которая часто представляет собой микросферу, может в некоторых случаях характеризоваться начальной повышенной скоростью высвобождения, которая обеспечивает выделение от примерно 5 до примерно 50% или более любого введенного материала или же иначе примерно 10, 15, 20, 25, 30 или 40% с последующим снижением скорости высвобождения.

Скорость высвобождения любого введенного материала может также характеризоваться количеством такого материала, выделившегося в день на мг полимерной матрицы. Например, в некоторых вариантах скорость высвобождения может меняться от примерно 1 нг или менее любого введенного материала, выделившегося в день на мг полимерной системы, до примерно 500 или более нг/день/мг. Или же скорость высвобождения может составлять около 0,05, 0,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 нг/день/мг. В других вариантах скорость высвобождения

любого включённого материала может составлять 10 000 нг/день/мг или даже больше. В некоторых случаях материалы, введённые и охарактеризованные по таким протоколам высвобождения, могут включать терапевтические агенты, наполнители и другие вещества.

Согласно другому аспекту скорость высвобождения любого материала из любой полимерной матрицы по изобретению может быть представлена как полупериод жизнеспособности такого материала в матрице.

Помимо варианта, использующего протоколы для *in vitro* определения скоростей высвобождения, данное изобретение предусматривает также *in vivo* протоколы, когда в некоторых случаях скорости высвобождения для полимерных систем могут быть определены *in vivo*. Другие методы анализа, пригодные для определения высвобождения любого материала из полимеров по изобретению, известны из уровня техники.

(д) Импланты и системы доставки.

В простейшем виде биоразлагаемая система доставки терапевтического агента состоит из дисперсии такого терапевтического агента в полимерной матрице. В других вариантах используется какое-либо изделие для имплантации, инъекции или введения полностью или частично другим способом изделия, содержащего композиции по изобретению. Особенно важно, чтобы такое изделие приводило к минимальному раздражению ткани при имплантации или инъекции в сосудистую ткань.

Биоразлагаемые системы доставки или изделия могут быть изготовлены различными известными методами. Полимер может быть переработан в расплаве с применением обычных методов экструзии или инъекционного формования или эти продукты могут быть получены растворением в подходящем растворителе с последующим формованием изделия и удалением растворителя выпариванием или экстракцией.

Как только система или имплант оказываются на месте, они должны оставаться в, по меньшей мере, частичном контакте с биологической жидкостью, такой как кровь, выделения внутренних органов, слизь мембран, спинномозговая жидкость и т.п., для обеспечения пролонгированного высвобождения любого инкапсулированного терапевтического агента.

(е) Способы получения.

Вообще, соединения по изобретению могут быть получены одним или двумя путями: мономеры, несущие терапевтические агенты, целевые лиганды и/или циклодекстрины могут подвергаться полимеризации или основные цепи полимеров могут взаимодействовать с терапевтическими агентами, целевыми лигандами и/или циклодекстринами.

Таким образом, согласно одному варианту данное изобретение предусматривает синтез соединений по изобретению путём взаимодействия мономеров M-L-CD и M-L-D (и, возможно, M-L-T), где

CD обозначает циклический фрагмент, такой как звено циклодекстрина или его производного;

L, независимо в каждом случае, обозначает линкерную группу или может отсутствовать;

D, независимо в каждом случае, обозначает один и тот же или разные терапевтические агенты или пролекарства;

T, независимо в каждом случае, обозначает один и тот же целевой лиганд или его предшественник и

M обозначает звено мономера, содержащее одну или более реакционно-способных групп, способных вступать в реакцию полимеризации с одним или несколькими другими M в реакционной смеси при условиях, которые вызывают полимеризацию мономеров.

В некоторых вариантах реакционная смесь может дополнительно содержать мономеры, которые не несут CD, T или D, например, для разделения дериватизованных звеньев мономеров в полимере.

Согласно альтернативному варианту данное изобретение охватывает синтез соединения по изобретению путём взаимодействия полимера Р (полимера, содержащего множество реакционноспособных групп, такие как карбоксильные, гидроксильные, тиольные, аминогруппы, эпоксидные группы и т.д.) с прививаемыми агентами X-L-CD и Y-L-D (и, возможно, Z-L-T), где

CD обозначает циклический фрагмент, такой как звено циклодекстрина или его производного;

L, независимо в каждом случае, обозначает линкерную группу или может отсутствовать;

D, независимо в каждом случае, обозначает один и тот же или разные терапевтические агенты или пролекарства;

T, независимо в каждом случае, обозначает один и тот же целевой лиганд или его предшественник;

X, независимо в каждом случае, обозначает реакционноспособную группу, такую как карбоксильную, гидроксильную, тиольную, аминогруппу, эпоксидную группу и т.д., способную к образованию ковалентной связи с реакционно-способной группой полимера; и

Y и Z, независимо в каждом случае, обозначают хозяина включения или реакционноспособные группы, такие как карбоксильная, гидроксильная, тиольная, аминогруппа, эпоксидная группа и т.д., способные к образованию ковалентной связи с реакционноспособной группой полимера или комплексами включения с CD звеньями, привитыми на полимер, в условиях, которые приводят к образованию ковалентных связей с прививаемыми агентами и/или комплексов включения с полимером или звеньями, привитыми на полимер.

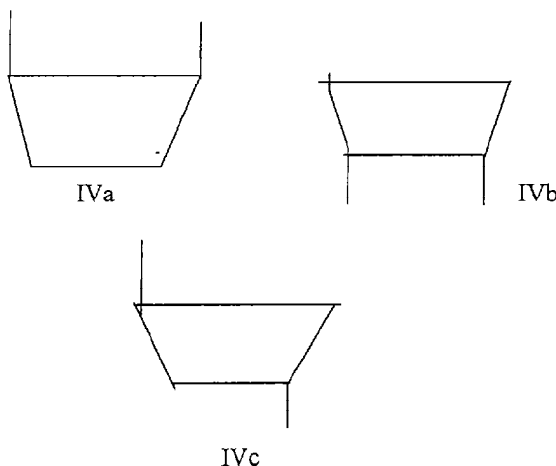
Например, если полимер в качестве реакционноспособных групп включает гидроксильные, тиольные или аминогруппы, прививаемые агенты могут содержать реакционноспособные группы, которые реагируют с ними, такие как изоцианатные, изотиоцианатные, хлорангидридные, ангидридные, эпоксидные, кетонные, сульфонилхлоридные, активированные карбоксильные (например, полученные при обработке карбоксильных групп активирующим агентом, таким как PyBrOP , карбонилдиимидазолом, или другим реагентом, который реагирует с карбоксильной группой с образованием звена, восприимчивого к нуклеофильной атаке) или другие электрофильные группы, известные специалисту. В некоторых вариантах может быть нужен катализатор для запуска реакции (например, кислота Льюиса, катализатор на основе переходного металла, аминное основание и т.д.), как очевидно для специалистов. В некоторых вариантах различные прививаемые агенты реагируют с полимером одновременно или практически одновременно (например, при одностадийной реакции) или реагируют с полимером последовательно (возможно, при проведении стадии очистки и/или промывки между реакциями).

Другой аспект изобретения относится к способу получения линейных или разветвлённых циклодекстринсодержащих полимеров, представленных формулами I–III. В то время как ниже описание фокусируется на получении линейных циклодекстриновых полимеров, специалисту ясно, что эти способы могут быть адаптированы для получения разветвлённых полимеров путём выбора соответствующего предшественника сомономера A.

Соответственно, один аспект изобретения относится к способу получения линейного сополимера циклодекстрина. Согласно изобретению линейный сополимер циклодекстрина может быть получен сополимеризацией предшественника циклодекстринового мономера, замещённого соответствующей отщепляемой группой с предшественником сомономера А, способным вытеснять удаляемые группы. Удаляемой группой, одной и той же или различной, может быть любая отщепляемая группа, известная из уровня техники, которая может быть замещена при сополимеризации с предшественником сомономера А.

Согласно предпочтительному варианту линейный циклодекстриновый сополимер может быть получен путём иодирования предшественника циклодекстринового мономера с образованием дийодированного предшественника циклодекстринового мономера и сополимеризации дийодированного предшественника циклодекстринового мономера с предшественником сомономера А с образованием линейного циклодекстринового сополимера, содержащего повторяющуюся единицу формулы II или III или их комбинацию. Хотя примеры, представленные ниже, описывают йодированные циклодекстриновые звенья, специалисту очевидно, что данное изобретение охватывает циклодекстриновые фрагменты, в которых вместо йода могут быть другие отщепляемые группы, такие как алкильная и арилсульфонатная.

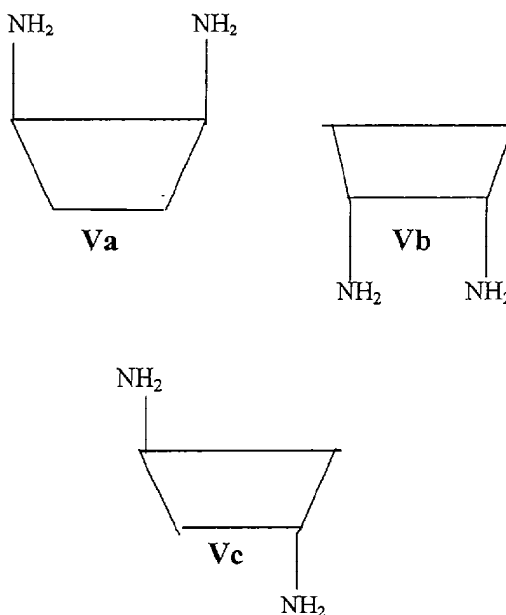
Согласно предпочтительному варианту предусмотрен способ получения линейного циклодекстринового сополимера путём иодирования предшественника циклодекстринового мономера, как описано выше, с образованием дийодированного предшественника циклодекстринового мономера формулы IVa, IVb, IVc:



Дийодированный циклодекстрин может быть получен любыми известными из уровня техники способами (Tabushi et al., J. Am. Chem. 106, 5267-5270 (1984); Tabushi et

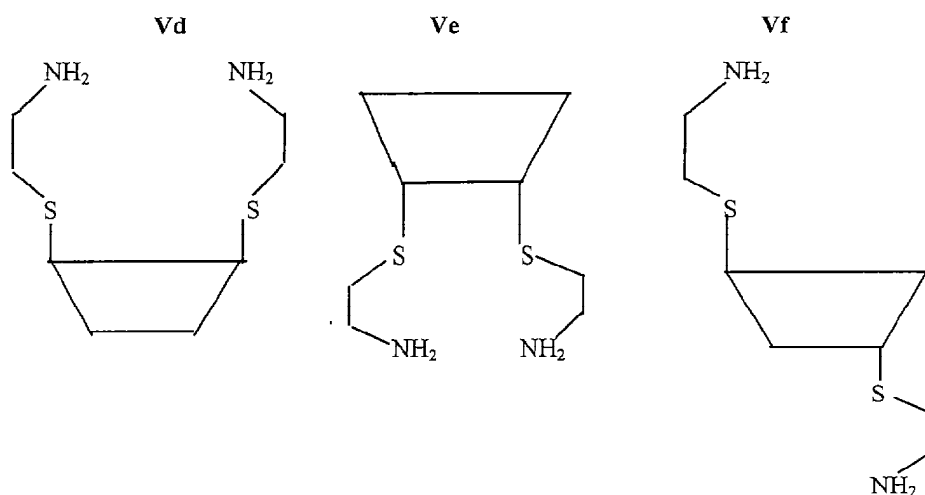
al., J. Am. Chem. 106, 4580-4584 (1984)). Например, β -циклодекстрин может реагировать с бифенил-4,4'-дисульфониохлоридом в присутствии безводного пиридина с образованием β -циклодекстрина с бифенил-4,4'-дисульфониохлоридными группами, который может затем реагировать с иодистым калием с получением дийод- β -циклодекстрина. Предшественник циклодекстринового мономера иодируется только в двух положениях. Путём сополимеризации дийодированного предшественника циклодекстринового мономера с предшественником сомономера А, как описано выше, может быть получен линейный циклодекстриновый полимер, содержащий повторяющуюся единицу Формулы Ia, Ib или их сочетание, как описано выше. Если желательно, йод или йодсодержащие группы могут быть замещены другими известными отщепляемыми группами.

Также согласно изобретению йодсодержащие группы и другая отщепляемая группа могут быть замещены группой, которая делает возможной реакцию с предшественником сомономера А, как описано выше. Например, дийодированный предшественник циклодекстринового мономера формулы IVa, IVb, IVc или их смесь может быть аминирована с образованием дийодированного предшественника циклодекстринового мономера формул Va, Vb, Vc или их смеси:



Диаминированный предшественник циклодекстринового мономера может быть получен любым известным из уровня техники способом (Tabushi et al., Tetrahedron Lett. 18: 11527-1530 (1977); Mungall et al., J. Org. Chem. 1659-1662 (1975)). Например, дийод- β -циклодекстрин может реагировать с азидом натрия и затем восстанавливаться с образованием диамино- β -циклодекстрина. Предшественник циклодекстринового

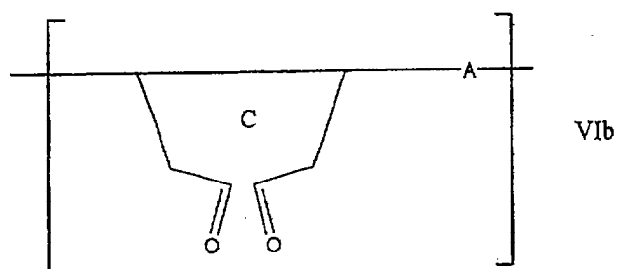
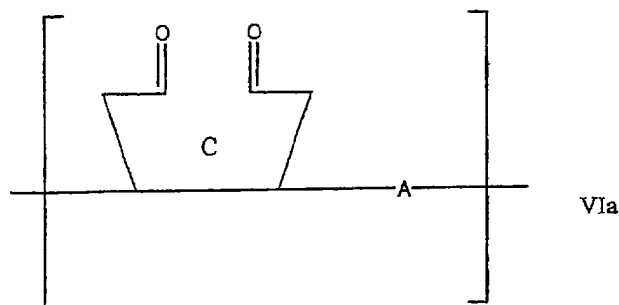
мономера аминируется только в двух положениях. Диаминированный предшественник
 циклодекстрина может затем сополимеризоваться с предшественником сомономера А,
 как описано выше, с получением линейного циклодекстринового сополимера,
 содержащего повторяющуюся единицу формул II-III или их смесь, как описано выше.
 Однако, функциональные аминогруппы диаминированного предшественника цикло-
 декстринового мономера не нуждаются в непосредственном присоединении к
 циклодекстриновому звену. Кроме того, функциональные аминогруппы или другие
 нуклеофильные группы могут быть введены путём замещения йода или других
 отщепляемых групп предшественника циклодекстринового мономера соединениями,
 содержащими аминогруппы, такими как, например, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (или
 динуклеофильное соединение общей формулы $\text{HW}-(\text{CR}_1\text{R}_2)_n-\text{WH}$, где W, независимо для
 каждого случая, обозначает O, S или NR_1 ; R_1 и R_2 , независимо для каждого случая,
 обозначают H, (не)замещённый алкил, (не)замещённый арил, (не)замещённый
 гетероалкил, (не)замещённый гетероарил), вместе с подходящим основанием, таким как
 гидрид металла, карбонат щелочного или щёлочноземельного металла или третичный
 амин с образованием диаминированного предшественника циклодекстринового мономера
 формул Vd, Ve, Vf или их смеси:



Линейный окисленный циклодекстрин, содержащий сополимер по изобретению
 может быть также получен окислением восстановленного линейного цикло-
 декстринсодержащего сополимера по изобретению, как описано ниже. Этот способ
 можно осуществлять, если только сомономер А не содержит чувствительного к
 окислению фрагмента или группы, например, тиольной.

Согласно изобретению линейный циклодекстриновый сополимер по изобретению
 может быть окислен с целью введения, по меньшей мере, одного окисленного

циклодекстринового звена в сополимер с тем, чтобы окисленный циклодекстриновый
 мономер стал частью основной цепи. Линейный циклодекстриновый сополимер, который
 содержит, по меньшей мере, одно окисленное циклодекстриновое звено, называется
 5 линейным окисленным циклодекстриновым сополимером или линейным окисленным
 циклодекстрин-содержащим полимером. Циклодекстриновый мономер может быть
 окислен или по вторичной, или по первичной гидроксильной группе циклодекстринового
 10 звена. Если в линейном окисленном циклодекстриновом сополимере по изобретению
 содержится более одного окисленного циклодекстринового звена, в нём могут находиться
 одинаковые или разные циклодекстриновые звенья, окисленные по первичному
 15 гидроксилу, или по вторичному гидроксилу, или по обеим группам. Для иллюстрации
 ниже приведена формула линейного окисленного циклодекстринового сополимера с
 окисленными вторичными гидроксильными группами, содержащего, по меньшей мере,
 20 одно звено формулы VIa или VIb:

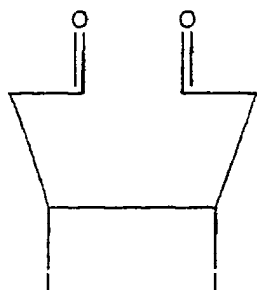


В формулах VIa и VIb С обозначает замещённый или незамещённый окисленный
 45 циклодекстриновый мономер и А-сомономер, ковалентно связанный с окисленным
 циклодекстрином С. Показано также, что окисление вторичных гидроксильных групп
 приводит к раскрытию кольца в циклодекстриновом звене и образованию альдегидных
 групп.

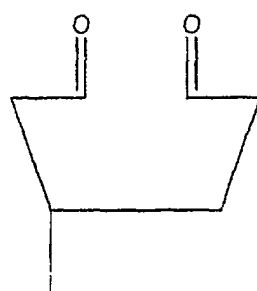
50 Линейный окисленный циклодекстриновый сополимер может быть получен
 окислением линейного циклодекстринового сополимера, как описано выше. Окисление

линейного циклодекстринового сополимера по изобретению можно осуществить известными методами (Hisamatsu et al., Starch 44: 188-191 (1992)). Предпочтительно использовать такой окислитель, как, например, периодат натрия. Специалистам очевидно, что при стандартных условиях окисления, степень окисления может меняться в зависимости от сополимера, и её можно изменять. Так, согласно одному из вариантов изобретения линейный окисленный сополимер по изобретению может содержать одно окисленное циклодекстриновое звено. Согласно другому варианту могут быть окислены практически все циклодекстриновые звенья в сополимере.

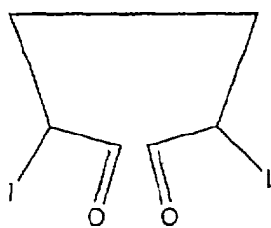
Другой способ получения линейного окисленного циклодекстринового сополимера по изобретению включает окисление дийодированного или диаминированного предшественника циклодекстринового мономера, описанного выше, с получением окисленного дийодированного или диаминированного предшественника циклодекстрина и сополимеризацией окисленного дийодированного или диаминированного предшественника циклодекстрина с предшественником сомономера А. Согласно предпочтительному варианту окисленный дийодированный предшественник циклодекстринового мономера формулы VIIa, VIIb, VIIc или их смеси:



VIIa



VIIc



VIIb

могут быть получены окислением дийодированного предшественника циклодекстринового мономера формулы IVa, IVb, IVc или их смеси, описанных выше. Согласно предпочтительному варианту окисленный диаминированный предшественник

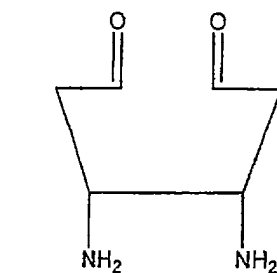
диаминированного циклодекстринового мономера формулы VIIIa, VIIIb, VIIIc или их смеси:

5

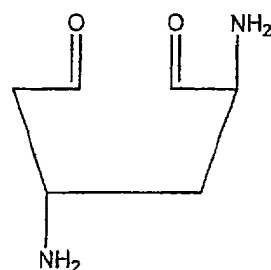
10

15

20

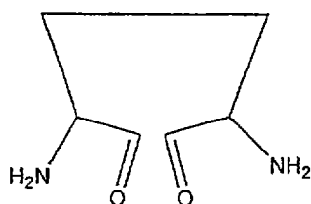


VIIIa



VIIIc

VIIIb



25

могут быть получены аминированием окисленного дийодированного предшественника циклодекстринового мономера формул VIIa, VIIb, VIIc или их смеси, описанных выше.

Согласно ещё одному предпочтительному варианту окисленный диаминированный предшественник циклодекстринового мономера формулы IXa, IXb, IXc или их смесь:

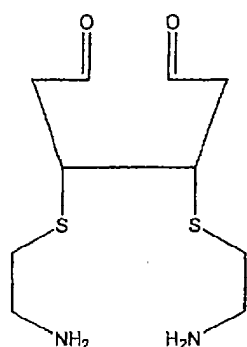
30

35

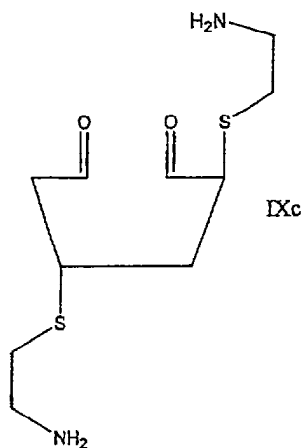
40

45

50

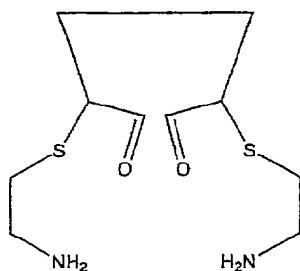


IXa



IXc

IXb



могут быть получены замещением йода или других отщепляемых групп окисленного предшественника циклодекстринового мономера, дизамещённого йодом или другими подходящими отщепляемыми группами amino- или другими нуклеофильными группами при помощи такого соединения, как $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (или динуклеофильное соединение общей формулы $\text{HW}-(\text{CR}_1\text{R}_2)_n-\text{WH}$, где W, независимо для каждого случая, обозначает O, S или NR_1 ; R_1 и R_2 , независимо для каждого случая, обозначают H, (не)замещённый алкил, (не)замещённый арил, (не)замещённый гетероалкил, (не)замещённый гетероарил), вместе с подходящим основанием, таким как гидрид металла, карбонат щелочного или щёлочноземельного металла или третичный амин.

Или же дийодированный или диаминированный предшественник циклодекстринового мономера, описанный выше, может быть получен окислением предшественника циклодекстринового мономера с образованием окисленного предшественника циклодекстринового мономера и затем дийодированием или диаминированием окисленного циклодекстринового мономера, как описано выше. Как указано выше, циклодекстриновый фрагмент может быть модифицирован другими отщепляемыми группами, отличными от йода и аминогрупп. Окисленный дийодированный или диаминированный предшественник циклодекстринового мономера может затем сополимеризоваться с предшественником сомономера А, как описано выше, с получением линейного окисленного циклодекстринового сополимера по изобретению. Линейный окисленный циклодекстриновый сополимер может быть далее модифицирован путём присоединения, по меньшей мере, одного лиганда к сополимеру. Лиганд используется такой, как описаны выше.

Согласно изобретению линейный циклодекстриновый сополимер или линейный окисленный циклодекстриновый сополимер могут быть присоединены к субстрату или привиты на него. Субстрат может быть любым известным специалисту. Согласно другому предпочтительному варианту изобретения линейный циклодекстриновый сополимер или линейный окисленный циклодекстриновый сополимер могут быть сшиты полимером с образованием, соответственно, сшитого линейного циклодекстринового сополимера или сшитого линейного окисленного циклодекстринового сополимера. Полимер может быть любым, способным к сшивке линейного или линейного окисленного циклодекстринового сополимера по изобретению (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтилен). Полимер также может быть таким же или другим линейным циклодекстриновым сополимером или линейным окисленным циклодекстриновым сополимером. Так, например, линейный циклодекстриновый сополимер может быть сшит любым

полимером, включая, но не ограничиваясь этим, этим же, другим линейным циклодекстриновым сополимером и линейным окисленным циклодекстриновым сополимером. Сшитый линейный циклодекстриновый сополимер по изобретению может
5 быть получен по реакции линейного циклодекстринового сополимера с полимером в присутствии сшивающего агента. Сшитый линейный окисленный циклодекстриновый сополимер по изобретению может быть получен взаимодействием линейного
10 окисленного циклодекстринового сополимера с полимером в присутствии сшивающего агента. Сшивающий агент может быть любым, известным из уровня техники. Примеры сшивающих агентов включают дигидразиды и дисульфиды. Согласно предпочтительному варианту сшивающий агент содержит лабильную группу с тем, чтобы из сшитого сополимера можно было, если это желательно, получить не сшитый.

Линейный циклодекстриновый сополимер или линейный окисленный циклодекстриновый сополимер по изобретению могут быть охарактеризованы известными методами. Такие методы или методики включают, без ограничения, гельпроникающую хроматографию (GPC), MALDI-TOF масс-спектрометрию, ^1H и ^{13}C ЯМР, светорассеяние и титрование.
25

Изобретение также предусматривает композицию на основе циклодекстрина, содержащую, по меньшей мере, один линейный циклодекстриновый сополимер и, по меньшей мере, один линейный окисленный циклодекстриновый сополимер по изобретению, описанный выше. Соответственно, один или оба из линейного циклодекстринового сополимера и линейного окисленного циклодекстринового сополимера могут быть сшиты другим полимером и/или связаны с лигандом, как описано выше. Терапевтические композиции по изобретению содержат терапевтический агент и линейный циклодекстриновый сополимер или линейный окисленный циклодекстриновый сополимер, включая сшитые сополимеры по изобретению.
30
40 Линейный циклодекстриновый сополимер, линейный окисленный циклодекстриновый сополимер и их сшитые производные описаны выше. Терапевтический агент может быть любым синтетическим или природным биологически активным терапевтическим агентом, включая известные. Примеры подходящих терапевтических агентов включают, но не ограничиваются этим, антибиотики, стероиды, полинуклеотиды (например, геномная ДНК, кДНК, мРНК, двухнитевая РНК и антисмысловые олигонуклеотиды), плазмиды, пептиды, фрагменты пептидов, маленькие молекулы (например, доксорубин) и другие биологически активные макромолекулы, такие как , например,
45
50 белки и ферменты.

(ж) Методы бизнеса.

Другие аспекты данного изобретения предусматривают методы осуществления
бизнеса. В частности, осуществление этих методов по изобретению может обеспечить
новые терапевтические композиции и их усовершенствованные составы. Эта техническая
стадия, будучи соединённой с одной или несколькими дополнительными стадиями,
обеспечивает новые подходы к проведению фармацевтического бизнеса или,
предпочтительно, бизнеса, связанного с наукой о жизнеобеспечении. Например,
терапевтический продукт, изготовленный способом по изобретению, может быть испытан
на эффективность его как лекарственного средства во множестве моделей болезней, при
этом потенциальные терапевтические композиции испытывают на токсичность и другие
свойства, обеспечивающие безопасность, до получения препаратов, их упаковки и
последующей продажи полученного препарата для лечения болезни. Кроме того, права на
развитие разработок и продажу таких препаратов или на проведение этих операций могут
быть лицензированы третьему лицу.

Соответственно, в некоторых вариантах данное изобретение обеспечивает метод
осуществления фармацевтического бизнеса, включающий:

а. изготовление препарата или набора, включающего фармацевтическую
композицию на основе любого из соединений по п.п. 1-4 и

б. маркетинг провайдерам работникам здравоохранения положительного эффекта
от применения препарата или набора при лечении болезни или состояния.

Согласно другим вариантам данное изобретение предусматривает способ проведения
фармацевтического бизнеса, включающий:

а. создание сети распространения для продажи фармацевтической композиции на
основе любого из соединений по п.п. 1-4 и

б. обеспечение инструкций для пациентов и врачей по применению препарата при
лечении болезни или состояния.

Согласно некоторым вариантам данное изобретение предусматривает способ
осуществления проведения фармацевтического бизнеса, включающий:

а. определение вида препарата и дозировки фармацевтической композиции на
основе любого из соединений по п.п. 1-4;

б. изучение терапевтических профилей препаратов, определённых на стадии (а), с
целью определения эффективности и токсичности на животных и

в. обеспечение сети распределения для продажи препарата и препаратов, идентифицированных на стадии (б) как имеющих приемлемый терапевтический профиль. Дополнительная стадия этого варианта включает создание группы продажи работникам здравоохранения препарата.

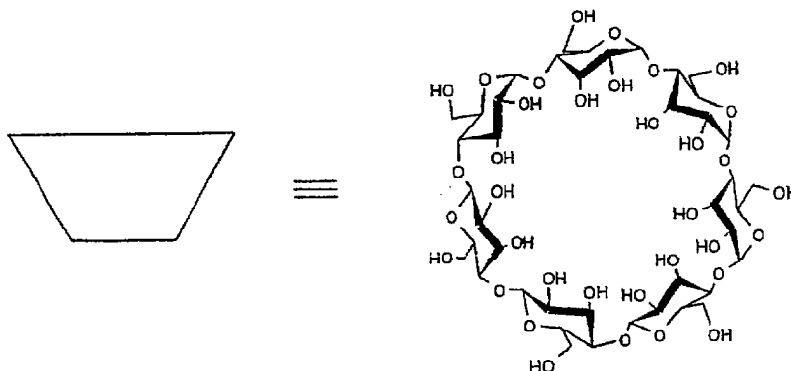
Согласно другим вариантам данное изобретение предусматривает способ осуществления фармацевтического бизнеса, включающий:

а. определение подходящего состава и дозировки фармацевтической композиции на основе любого из соединений по п.п. 1-4;

б. лицензирование третьему лицу прав на дальнейшие разработку и продажу препарата.

Примеры.

Вещества. β -циклодекстрин, « β -CD», (Cerestar USA, Inc. of Hammond, IN) высушивали в вакууме ($<0,1$ мТорр) при 120°C в течение 12 часов перед использованием.

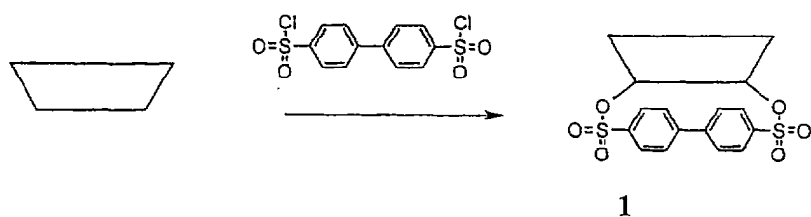


Все безводные растворители, растворители для ЖХВР и другие обычные органические растворители покупали у промышленных поставщиков и использовали без дальнейшей очистки. Бифенил-4,4'-дисульфонилхлорид (Aldrich Chemical Company, Inc. of Milwaukee, WI) перекристаллизовывали из смеси хлороформ/гексаны. Иодид калия получали в виде порошка в ступке с пестиком и сушили в печи при 200°C . Полиэтиленгликоль-дипропаноиксукцинимид (PEG-DiSPA, MW 3400), полиэтиленгликоль-дибутаноиксукцинимид (PEG-DiSBA, MW 3400) и полиэтиленгликоль-дибензотриазолкарбонат (PEG-DiBTC, MW 3400) покупали в Nektar (Huntsville, AL). Полиэтиленгликоль-ди-п-нитрофенолкарбонат (PEG-DiNPC, MW 3400) приобретали у фирмы Sigma (St. Louis, MO). CPT покупали в Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Плазму человека приобретали в фирме Sigma и воссоздавали

дистиллированной водой. Плазму мыши готовили центробежным удалением клеток крови из образцов свежей крови, собранной от самок мыши BALB/C (Charles River).
 5 6^A,6^D-дийод-6^A, 6^D-дидеокси-β-циклодекстрин (CDDI, Схема 2) синтезировали согласно ранее описанной процедуре Hwang et al. (Bioconjugate Chem., 12, 280-290).
 Деионизованную воду (18-MΩ-см) получали пропусканием водопроводной деионизованной воды через очистительную систему Barnstead E-pure. Спектры ЯМР
 10 записывались на приборе Bruker AMX 500 МГц или спектрометре Varian 300 МГц. Масс-спектральный (MS) анализ проводили, используя или масс-спектрометр с электрораспылением, снабжённый LCQ ионной ловушкой (Thermo Finnigan) и
 15 снабжённый источником ионизации при распылении, или MALDI-TOF масс-спектрометр (Voyager DE-Pro, Applied Biosystems). Молекулярные веса образцов полимеров определяли на системе GPC (гельпроникающая хроматография), снабжённой Hitachi L-
 20 6200 Intelligent Pump, детекторе Anspec RI (ERC-7512, Erma, Inc.), детекторах DLS (PD 2020), и двойных колонках гельпроникающей хроматографии (PL-aquagel-OH-40 8 мкм 300 мм x 7,5 мм, Polymer Laboratory), калиброванных с использованием полиэтилен-
 25 гликолевого эталона, элюирование осуществляли с применением PBS (1x) с концентрацией 20-50 мг/мл и скорости истечения 0,7 мл/мин при комнатной температуре. Производные CD анализировали на колонке с обращённой фазой C-18 на системе ЖХВР,
 30 снабжённой детектором УФ (System Gold 168 Detector, Beckman Coulter) и детектором испарительного светорассеяния (ELS) (Sedex 75, Sedere, France). CPT, производные CPT и конъюгаты полимер-CPT анализировали на системах ЖХВР на колонке с обращённой фазой C-18 (HIRPB-4438, 4,6 x 150 мм, Richard Scientific), снабжённой флуоресцентным
 35 детектором (FD-500, GTU/ Spectro Vision, Groton Technology, Inc.), с использованием градиента фосфатного буфера (pH 4,1) и ацетонитрила. Длины волн возбуждения и эмиссии детектора флуоресценции равнялись 370 нм и 440 нм, соответственно.

40 **Пример 1:** Бифенил-4,4'-дисульфонил-А,Д-содержащий β-циклодекстрин, **1** (Tabushi et al., J. Am. Chem. Soc. 106, 5267-5270 (1984)).

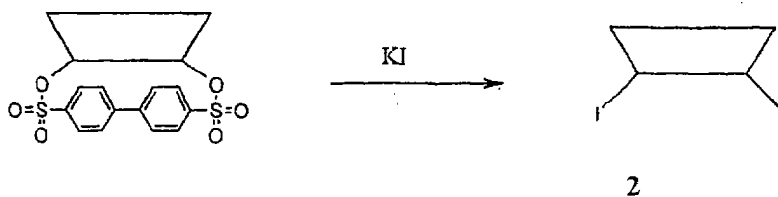
45 Схема XV.



В круглодонную колбу объёмом 500 мл, снабжённую магнитной мешалкой, адаптером Шленка и перегородкой, загружали 7,92 г (6,98 ммол) сухого β -циклодекстрина и 250 мл безводного пиридина (Aldrich Chemical Company, Inc.).
 Полученный раствор перемешивали при 50°C в атмосфере азота, в то время как четырьмя
 равными порциями с интервалами в 15 минут добавляли 2,204 г (6,28 ммол) бифенил-4,4'-
 дисульфонилхлорида. После перемешивания при 50°C в течение ещё 3 ч растворитель
 удаляли в вакууме и остаток подвергали анализу методом хроматографии на колонке с
 обращённой фазой с использованием градиента элюирования 0-40% ацетонитрила в воде.
 Фракции анализировали методом ЖХВР и соединяли соответствующие фракции. После
 удаления ацетонитрила в роторном выпаривателе полученную водную суспензию
 подвергали лиофилизации до получения сухого продукта. Получали 3,39 г (38%)
 продукта **1** в виде бесцветного твёрдого продукта.

Пример 2: 6^A,6^D-дийод-6^A,6^D-дидезокси- β -циклодекстрин, **2** (Tabushi et al., J. Am. Chem. 106, 4580-4584 (1984)).

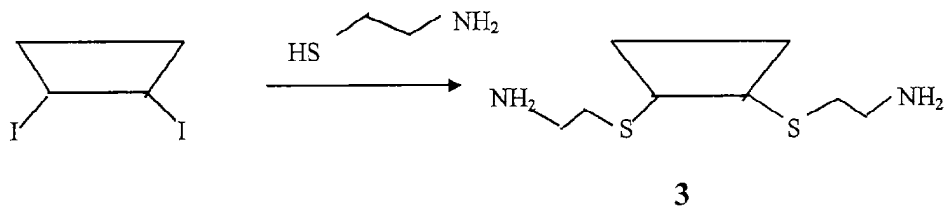
Схема XVI.



В центробежную трубку объёмом 40 мл, снабжённую магнитной мешалкой, адаптером Шленка и перегородкой, загружали 1,02 г (7,2 ммол) соединения **1**, 3,54 г (21,3 ммол) сухого порошка йодида калия (Aldrich) и 15 мл безводного N,N-диметилформамида (DMF) (Aldrich). Полученную суспензию перемешивали при 80°C в атмосфере азота в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры отделяли
 фильтрованием твёрдый продукт и собирали надосадочную жидкость. Твёрдый осадок
 промывали второй порцией безводного DMF, соединяли надосадочные жидкости и
 концентрировали в вакууме. Затем остаток растворяли в 14 мл воды и охлаждали на
 ледяной бане перед добавлением при энергичном перемешивании 0,75 мл (7,3 ммол)
 тетрахлорэтилена (Aldrich). Осаждённый продукт отфильтровывали через стеклянную
 фритту и промывали небольшим количеством ацетона перед сушкой над P₂O₅ в вакууме в
 течение 14 ч. Получали 0,90 г (92%) продукта **2** в виде белого твёрдого вещества.

Пример 3: 6^A,6^D-бис-(2-аминоэтилтио)-6^A,6^D-дидезокси-β-циклодекстрин, **3** (Tabushi, I, Shimokawa K., Fugita K., Tetrahedron Letters, 1977, 1527-1530).

Схема XVII.



В колбу Шленка объемом 25 мл, снабжённую магнитной мешалкой и перегородкой, загружали 0,91 мл (7,37 ммол) 0,81М раствора 2-аминоэтилтиолята натрия в этаноле (Fieser, L.F., Fieser M. Reagents for Organic Synthesis; Wiley: New York, 1967; vol. 3, p.p. 265-266). Раствор выпаривали досуха и твёрдый продукт растворяли в 5 мл безводного DMF (Aldrich). Добавляли 6^A,6^D-дийод-6^A,6^D-дидезокси-β-циклодекстрин, (**2**) (100 мг, 7,38 x 10⁻⁵ мол) и полученную суспензию перемешивали при 60°C в атмосфере азота в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры раствор концентрировали в вакууме и остаток растворяли в воде. После подкисления 0,1N HCl раствор пропускали через колонку с ионообменником Тоуорpearl SP-650M (NH₄⁺ форма) и продукт элюировали с градиентом 0-0,4М бикарбоната аммония. Фракции собирали и подвергали лиофилизации досуха. Получали 80 мг (79%) продукта **3** в виде белого порошка.

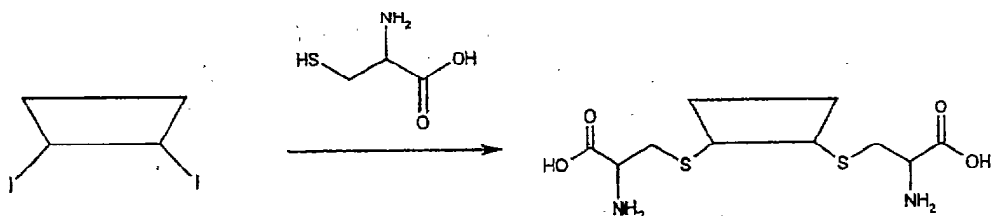
Альтернативный синтез дицистамина β-CD-3.

К раствору 4,69 г (3,17 ммол) продукта **2** в 100 мл дегазированной воды добавляли 0,489 г (6,34 ммол) свежесублимированного цистамина. Раствор перемешивали при температуре рефлюкса в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры и подкисления 1N HCl раствор пропускали через колонку с ионообменником Тоуорpearl SP-650M (NH₄⁺ форма) и использовали градиент 0-0,2М бикарбоната аммония. Фракции соединяли и проводили лиофилизацию досуха. Получали 1,87 г (39% выход) белого твёрдого вещества. Это вещество анализировали методом TLC (силикагель, n-PrOH-AcOEt-H₂O-NH₃ водн. 5/3/3/1, детектирование нингидрином), основное пятно соответствовало продукту **3**. Снимали масс-спектры MALDI-TOF (метод ионизации лазерной десорбцией/ионизацией с времяпролётным масс-анализатором) на приборе ELITE 2 м, поставляемом PerSeptive Biosystems, Inc. MALDI-TOF m/z рассчит. для **3** 1252, найдено 1253,2 [M+H]⁺, 1275,5 [M+Na]⁺, 1291 [M+K]⁺. ¹³C ЯМР (Bruker 500 МГц, D₂O) δ

ppm: 32,1 (S-CH₂) и 38,8 (CH₂-NH₂), 32,9 (C6 adjacent to S), 60,2 (C6 adjacent to OH), 70,8, 71,4, 72,5 (C2, C3, C5), 81,8 (C4), 101,7 (C1).

Пример 4: 6^A,6^D-бис-(2-амино-2-карбоксилэтилтио)-6^A,6^D-дидезокси-β-цикло-декстрин, **4** (CD-БисЦис).

Схема XVIII.

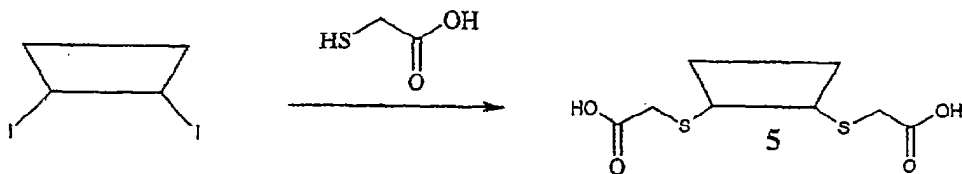


165 мл 0,1М буферного карбоната натрия дегазировали в течение 45 минут в двугорлой круглодонной колбе объемом 500 мл, снабжённой магнитной мешалкой, конденсатором и перегородкой. К этому раствору добавляли 1,96 г (16,2 ммол) L-цистеина и 10,0 г (73,8 ммол) диод, дезокси-β-циклодекстрина **2**. Полученную суспензию нагревали при температуре рефлюкса в течение 4,5 ч до получения прозрачного (бесцветного) раствора. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и подкисляли до pH 3, используя 1N HCl. Полученный продукт осаждали при медленном добавлении ацетона (весовое отношение к раствору 3:1). Получали 9,0 г технического продукта, содержащего CD-бисцистеин (90,0%), не прореагировавший циклодекстрин, CD-моноцистеин и цистин. Полученный твёрдый продукт подвергали анионообменной хроматографии (SuperQ 650M, Tosoh Bioscience) с использованием градиента 0-0,4 М бикарбоната аммония. Все фракции анализировали методом ЖХВР. Нужные фракции соединяли и уменьшали количество растворителя до 100 мл под вакуумом. Конечный продукт осаждали ацетоном или метанолом (весовое отношение к раствору 3:1). Выход продукта **4** составил 60-90%. ¹H ЯМР (D₂O) δ 5,08 (m, 7H CD-2-CH), 3.79-3.94 (m, 30H, CD-3,4-CH, CD-CH₂, Cys-CH), 3.49-3.62 (m, 14H, CD-5, 6-CH), 2.92-3.30 (m, 4H, Cys-CH₂). ¹³C ЯМР (D₂O) δ 172.3, 101.9, 83.9, 81.6, 81.5, 73.3, 72.2, 72.0, 60.7, 54.0, 34.0, 30.6. ESI/MS (m/z): 1342 [M]⁺, 1364 [M+Na]⁺.

Чистота продукта **4** была подтверждена методом ЖХВР.

Пример 5: 6^A,6^D-бис-(карбоксиметилтио)-6^A,6^D-дидезокси-β-циклодекстрин, **5** (CDDM).

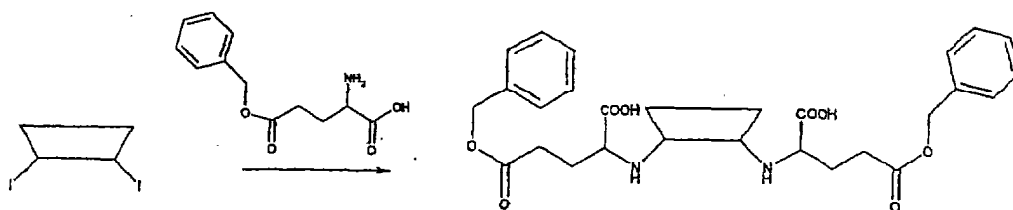
Схема XIX.



50 мл 0,1М раствора карбоната натрия дегазировали в течение 2 ч в 3-горлой
 10 круглодонной колбе объёмом 100 мл, снабжённой магнитной мешалкой, конденсатором и
 перегородкой. В колбу впрыскивали меркаптоуксусную кислоту (0,46 мл, 6,64 ммол), рН
 раствора довели до 9,3 при помощи 1N гидроокиси натрия. К этому полученному
 15 раствору добавляли 3,00 г (2,21 ммол) дийод-β-циклодекстрина **2** и нагревали при 80°C в
 течение часа. Температуру раствора повышали каждый час на 10°C до тех пор, пока она
 не достигла 100°C. После нагревания в течение 3 ч при температуре рефлюкса
 20 прозрачный бесцветный раствор охлаждали до комнатной температуры и подкисляли до
 рН 3,5 при помощи 1N HCl. Технический продукт дробили при медленном добавлении
 ацетона (весовое отношение к раствору 3:1). Полученный твёрдый продукт подвергали
 25 анионообменной хроматографии используя градиент 0-0,4 М раствора бикарбоната
 аммония. Получали 1,8 г (63,4%) продукта **5** в виде бесцветного твёрдого вещества.
 ESI/MS (m/z): 1281 [M]⁺. Чистота этого соединения была подтверждена методом ЖХВР.

30 Пример 6: CD-бис(глутаминовой кислоты-γ-бензиловый эфир) **6**.

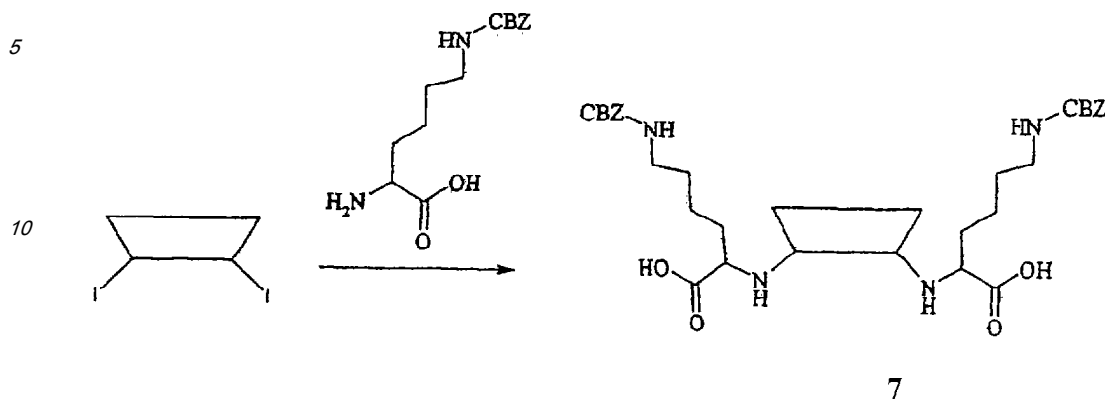
Схема XX.



В круглодонную колбу, снабжённую магнитной мешалкой, конденсатором и
 перегородкой, загружали 0,101 г (0,425 ммол) H-Glu(OBzl)-OH и 0,15 г (0,106 ммол)
 45 дийод-β-циклодекстрина **2** в 5 мл дегазированного 0,1М раствора карбоната натрия.
 Раствор нагревали при 100°C в течение 2 ч. Затем раствор охлаждали до комнатной
 температуры и подкисляли до рН 4 перед диализом в MWCO 500 membranes в течение 24
 50 ч. Выход продукта **6** составил 0,142 г (83,6%).

Пример 7: CD-бисLys(Z), 7.

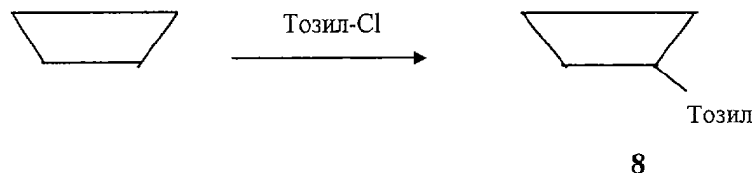
Схема XXI.



В круглодонную колбу объёмом 50 мл, снабжённую магнитной мешалкой, конденсатором и перегородкой, загружали 0,124 г (0,443 ммол) Н-лизин(Z)-ОН и 0,15 г (0,111 ммол) дийод-β-циклодекстрина **2** в 5 мл дегазированного раствора карбоната натрия. Раствор нагревали при 100°C в течение 4 ч. Затем раствор фильтровали и доводили pH фильтрата до 8,5 перед диализом в MWCO 500 membranes в течение 24 ч. Выход продукта **7** составил 0,124 г (68,9%).

Пример 8: Синтез β-циклодекстрин-тозилата, **8** (Melton L. D. and Slessor K. N., Carbohydrate Research, 18, p. 29 (1971)).

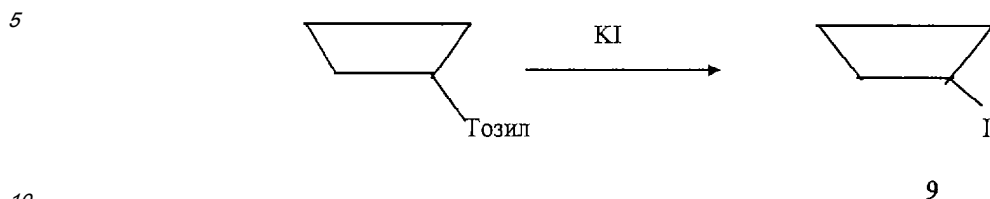
Схема XXII.



В круглодонную колбу объёмом 500 мл, снабжённую магнитной мешалкой, вакуумным адаптером и перегородкой, загружали раствор сухого β-цикло-декстрина (8,530 г, 7,51 ммол) и 200 мл сухого пиридина. Раствор охлаждали до 0°C перед добавлением 1,29 г (6,76 ммол) тозилхлорида. Полученный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение ночи. Пиридин удаляли в вакууме. Полученный остаток перекристаллизовывали дважды из 40 мл горячей воды и получали 7,54 г (88%) белого кристаллического вещества **8**.

Пример 9: Синтез йод-β-циклодекстрина, **9**.

Схема XXIII.

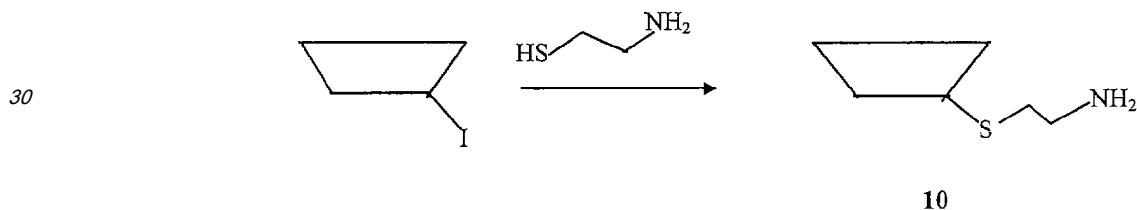


15 В круглодонную колбу, снабжённую магнитной мешалкой и адаптером Шленка, загружали продукт **8**, 15 экв. йодистого калия и DMF. Полученную смесь нагревали при 80°C в течение 3 ч, затем реакционной смеси давали охладиться до комнатной

20 температуры. Затем смесь отфильтровывали для удаления осадка и фильтрат выпаривали досуха и растворяли в воде при 0°C. Добавляли тетрахлорэтилен и полученную суспензию перемешивали энергично при 0°C в течение 20 минут. На стеклянной фритте собирали продукт **9**, растирали с ацетоном и хранили над P₂O₅.

Пример 10: Синтез цистамин-β-циклодекстрина, **10**.

Схема XXIV.



35 В раствор продукта **9** в 100 мл дегазированной воды добавляли 1 экв. свежесублимированного цистамина. Раствор перемешивали при температуре рефлюкса в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры и подкисления 1N HCl раствор

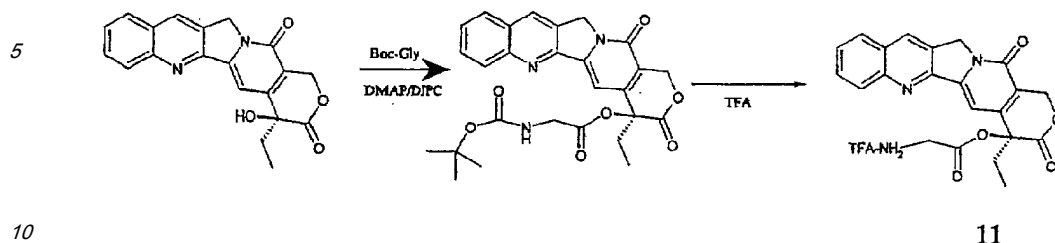
40 помещали в колонку с ионообменником Toyopearl SP-650M (NH₄⁺ форма) и элюировали продукт, используя градиент бикарбоната аммония. Соответствующие фракции собирали и подвергали лиофилизации досуха, получая продукт **10**.

45

50

Пример 11: Синтез Gly-CPT, 11 (Greenwald et al., Bioorg. Med. Chem., 1998, 6, 551-562).

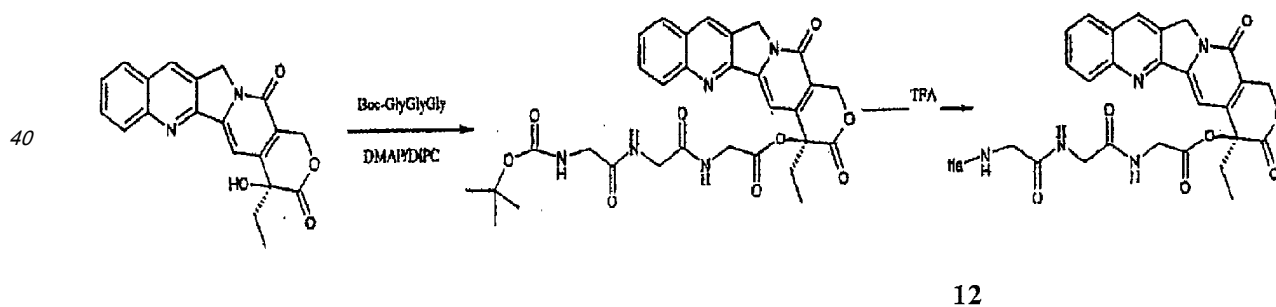
Схема XXV.



Трет-Вос-глицин (0,9 г, 4,7 ммол) растворяли в 350 мл безводного метиленхлорида при комнатной температуре, и к этому раствору добавляли DIPC (0,75 мл, 4,7 ммол), DMAP (382 мг, 3,13 ммол) и камптотецин (0,55 г, 1,57 ммол) при 0°C. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и оставляли на 16 ч. Раствор промывали 0,1N HCl, сушили и выпаривали при пониженном давлении с получением белого твёрдого вещества, которое перекристаллизовывали из метанола с получением камптотецин-20-эфира трет-Вос-глицина: ¹H ЯМР (DMSO-d₆) 7.85-8.8 (m), 5.5 (s), 5.3 (s), 4 (m), 2.1 (m), 1.6 (s), 1.3 (d), 0.9 t). Камптотецин-20-эфир трет-Вос-глицина (0,595 г, 1,06 ммол) растворяли в смеси метиленхлорида (7,5 мл) и трифторуксусной кислоты (7,5 мл) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли и остаток перекристаллизовывали из метиленхлорида и простого эфира с получением 0,45 г продукта 11. ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7.7-8.5 (m), 7.2(s), 5.6 (s), 5.4 (s), 4.4 (m), 2.2(m), 1.6 (d), 1.0 (t); ¹³C ЯМР (DMSO-d₆) δ 168.6, 166.6, 156.5, 152.2, 147.9, 146.2, 144.3, 131.9, 130.6, 129.7, 128.8, 128.6, 128.0, 127.8, 119.0, 95.0, 77.6, 66.6, 50.5, 47.9, 30.2, 15.9, 7.9. ESI/MS (m/z) ожидаемое 405; найдено 406 (M+H).

Пример 12: Синтез GlyGlyGly-CPT, 12.

Схема XXVI.



Трет-Вос-GlyGlyGly (1,359 г, 4,7 ммол) растворяли в 350 мл безводного метиленхлорида при комнатной температуре и добавляли к этому раствору DIPC (0,75 мл, 4,7 ммол), DMAP (382 мг, 3,13 ммол) и камптотецин (0,55 г, 1,57 ммол) при 0°C.

Реакционной смеси дают нагреться до комнатной температуры и оставляют на 16 ч.
 Раствор промывали 0,1N HCl, сушили и выпаривали при пониженном давлении с
 получением белого твёрдого вещества, которое перекристаллизовывали из метанола с
 получением камптотецин-20-эфира трет-Бос-GlyGlyGly: ^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 8.40 (s),
 8.25 (d), 7.91 (d), 7.78 (m), 7.65 (t) 7.26(s), 7.05 (br,s), 5.65 (d), 5.40 (d), 5.25 (s), 5.10 (br,s),
 3.75-4.42 (m), 2.15-2.35 (m), 1.45 (s), 0.95 (t). Камптотецин-20-эфира трет-Бос-GlyGlyGly
 (1,5 г, 1,06 ммол) растворяли в смеси метиленхлорида (10 мл) и трифторуксусной кислоты
 (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Растворитель удаляли
 под вакуумом и остаток растворяли в метиленхлориде. Раствор выливали в простой эфир
 с мгновенным получением осадка (жёлтого). Осадок отфильтровывали и промывали
 холодным эфиром с получением 1,31 г продукта **12**. ^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 8.79(s), 7.75-
 8.61(m), 7.10(s), 5.55(s), 3.90-4.37(m), 3.86(s), 3.54(s), 2.11-2.23(m), 0.95(t); ESI/MS (m/z)
 ожидаемое 519; найдено 520 (M+H).

Стабильность связи СРТ-пептидный эфир.

Продукты **11** и **12** растворяли в PBS буфере (pH 7,4) при комнатной температуре с
 получением раствора с концентрацией примерно 500 мкг/мл. Этот раствор затем
 разбавляли 8,5%-ной H_3PO_4 с получением концентрации 10 мкг/мл. Скорость гидролиза
 определяли методом ЖХВР на колонке обращённой фазой C_{18} с использованием
 детектора флуоресценции и буфера ацетонитрил/фосфат калия 50/50 об/об (pH 4,1).
 Обнаруживали пики **11** (или **12**) и высвободившегося СРТ (лактон). Стабильность
 сложноэфирной связи в водном растворе зависит от длины пептида. Следовательно,
 скорость высвобождения лекарства (скорость гидролиза) может регулироваться
 изменением длины пептида – см. Фиг.2.

Стабильность лактонной формы СРТ, **11** и **12** в солевом растворе с фосфатным буфером (PBS).

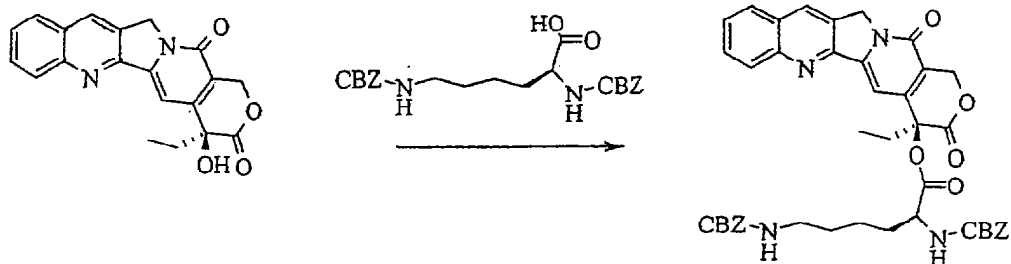
СРТ, **11** и **12** растворяли в DMSO с концентрацией 1 мг/мл и затем разбавляли до
 концентрации 1 мкг/мл при помощи PBS (x1, pH 7,4). 30 мкл раствора впрыскивали в
 колонку ЖХВР при комнатной температуре с выбранными интервалами времени.
 Наблюдали пик лактонной формы СРТ у СРТ, **11** или **12**.

Скорость раскрытия лактонного кольца для соединений **11**, **12** и СРТ изучали в
 PBS буфере (pH 7,4). И **11**, и **12** очень стабильны против раскрытия кольца и не были
 обнаружены карбоксилатные формы **11** и **12** во время опыта (7ч). С другой стороны,

более 60% лактонной формы СРТ превращалось в его карбоксилатную форму за тот же промежуток времени (см. Фиг.3).

Пример 13: Синтез Lys(BisCBZ)-СРТ, 13.

Схема XXVII.



13

N,N-БисCBZ-лизин (311 мг, 0,75 ммол) растворяли в 56 мл безводного метилехлорида при комнатной температуре. К этому раствору добавляли DIPС (0,12 мл, 0,75 ммол), DMAP (0,61 мг, 0,5 ммол) и камптотецин (0,087 г, 0,25 ммол) при 0°C. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и оставляли на 16 ч. Раствор промывали 0,1N HCl, сушили и выпаривали при пониженном давлении с получением твёрдого вещества светло-жёлтого цвета, которое перекристаллизовывали из метанола с получением камптотецин-20-эфира N,N-БисCBZ-Lys, 13. Очистка соединения 13 подтверждалась данными TLC и ЖХВР.

Гидролиз 13 в водном растворе протекает очень медленно и не подтверждается ЖХВР при использовании УФ-детектора. Скорость гидролиза эфирной связи СРТ-пептидного линкера может регулироваться изменением длины пептида, как показано в Примере 12, но также использованием различных аминокислот, связанных непосредственно с ОН-группами СРТ.

Трансформация лактона в карбоксилатную форму СРТ и 13 изучалась также в PBS буфере. Было обнаружено, что превращение лактонной формы в карбоксилатную форму соединения 13 протекает гораздо медленнее, чем у свободного СРТ, что показывает, что лактон (активная форма лекарства) может быть стабилизирован при образовании сложного эфира с ОН-группами СРТ в положении 20 (см. Фиг.4).

Пример 14: Синтез Lys-Gly-CPT, 14.

Соединение 11 растворяют в хлороформе. Добавляют N,N-ДиВос-Lys-NHS (1 экв.) с последующим добавлением триэтиламина (1,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч и дважды экстрагировали водой и затем сушили при помощи $MgSO_4$. Растворитель удаляли в условиях глубокого вакуума с получением N,N-ДиВос-Lys-Gly-CPT. К этому соединению добавляли смесь равных объёмов CH_2Cl_2 и трифторуксусной кислоты и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем удаляли в вакууме растворитель. Остаток растворяли в $CHCl_3$. Простой эфир добавляли к раствору для выделения продукта 14. Осадок промывали несколько раз эфиром и затем сушили под вакуумом. Его очищают на хроматографической колонке с силикагелем с получением соединения 14 в виде соли с трифторуксусной кислотой.

Пример 15: Синтез Suc-Gly-CPT, 15.

Раствор янтарного ангидрида смешивают с соединением 11 (1 экв) в сухом $CHCl_3$ в присутствии каталитического количества DMAP и DIEA (1 экв). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч с образованием соединения 15, которое очищают кристаллизацией.

Пример 16: Синтез Glu-Suc-Gly-CPT, 16.

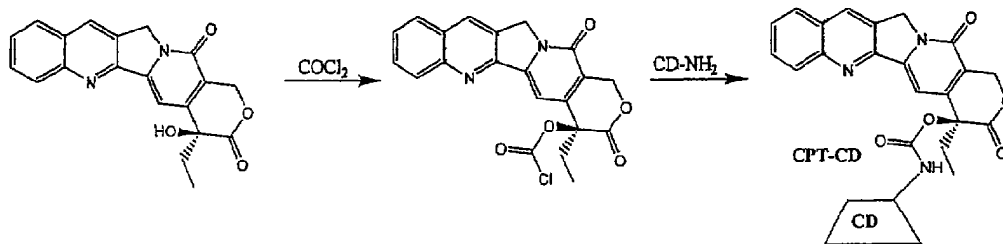
Соединение 15 превращают в его NHS эфир, используя традиционный метод DCC/NHS. NHS эфир соединения 15 затем реагирует с глутаминовой кислотой (1,0 экв) в DMSO в присутствии триэтиламина. Раствор добавляли к простому эфиру для осаждения соединения 16. Соединение 16 очищали кристаллизацией.

Пример 17: Синтез Glu-Бис(GlyCPT), 17.

Соединение 11 и BOC-Glu(NHS)-NHS (0,4 экв) смешивали в среде $CHCl_3$ в атмосфере аргона перед добавлением к смеси триэтиламина (1 экв.). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч и затем промывали подкисленной водой. Органический слой высушивали и удаляли в вакууме растворитель. Полученное соединение очищали с использованием хроматографии на колонке с силикагелем. Очищенное соединение затем растворяли в смеси равных объёмов ТФК и CH_2Cl_2 . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем выливали в простой эфир. Осадок соединения 17 промывали эфиром и сушили под вакуумом.

Пример 18: Синтез циклодекстрин-камптотоцина, **18**.

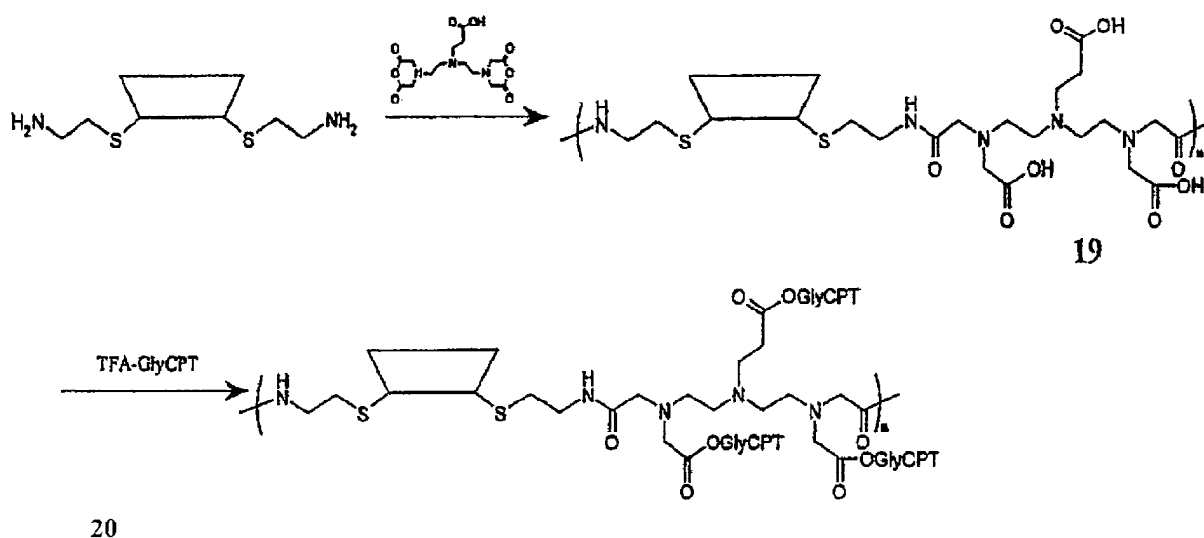
Схема XXVIII.

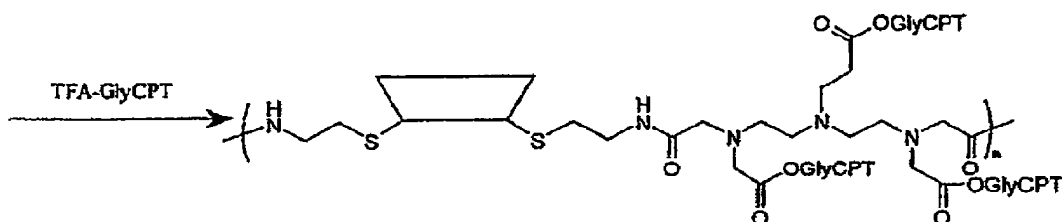
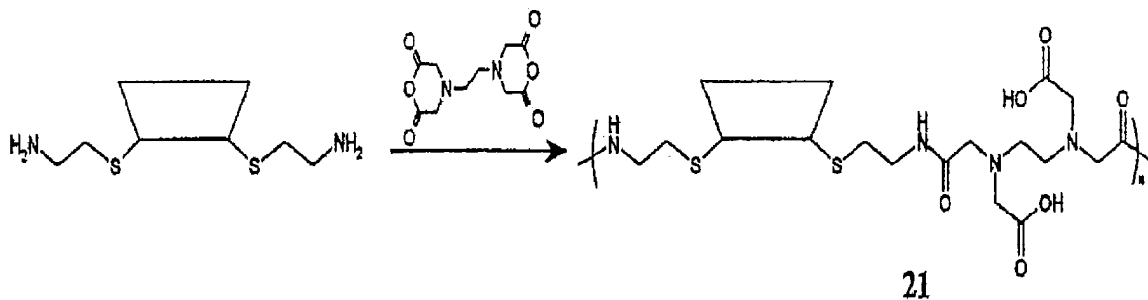


СРТ (197 мг, 0,566 ммол) вакуумировали в течение 30 минут. В атмосфере аргона добавляли сухой хлороформ (100 мл). При 0°C добавляли фосген (1,34 мл, 20% раствор в толуоле). Удаляли ледяную баню и раствор нагревали до комнатной температуры. Двумя часами позже растворитель удаляли в условиях глубокого вакуума. К остатку добавляли сухой DMSO (50 мл) с последующим добавлением 200 мг CD-NH_2 (Cyclodextrin Technology, Inc.) и триэтиламин (4 мл, избыток). Через 16 ч раствор выливали в 200 мл эфира. Остаток тщательно промывали эфиром и высушивали. Получали 167 мг жёлтого порошка (**18**) (выход 62%). Метод TLC (силикагель) анализа **18**: $R_f=0$ (проявление $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ об/об = 5/1). Метод TLC СРТ: $R_f=0,65$ (проявление $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ об/об = 5/1). Растворимость: > 10 мг/мл в воде. Это показывает, что растворимость СРТ в воде может быть значительно увеличена, когда он ковалентно присоединён к молекуле циклодекстрина (растворимость в воде свободного СРТ составляет $< 0,004$ мг/мл).

Пример 19: Синтез сополимера CDDC-диангидрид, **19**, **21** и его конъюгата с СРТ, **20**, **22**.

Схема XXIX.





А: Диангидрид этилендиаминтетрауксусной кислоты (25,6 мг, 0,1 ммол) и CDDC (3, 125,3 мг, 0,1 ммол) растворяли в 2 мл сухого DMSO. Раствор нагревали при 50°C в течение 72 ч. К смеси добавляли воду с последующим добавлением 1N NaOH до достижения pH, равного примерно 12. Полимер подвергали диализу в мембранном 10 000 MWCO в течение 24 ч. На диализной мембране наблюдалось осаждение. Твёрдый продукт удаляли и оставшийся раствор снова подвергали диализу в мембранном 10 000 MWCO в течение 24 ч. После лиофилизации получали белый порошок соединения **19** (75 мг).

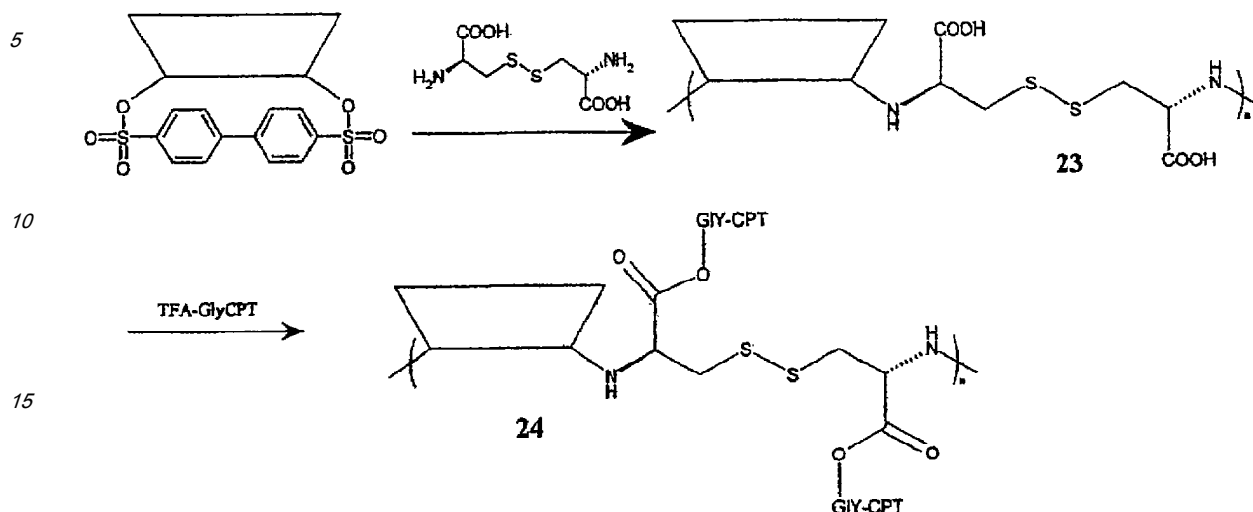
К раствору полимера **19**/DMSO в присутствии EDC (2 экв), NHS (1 экв) и DIEA (1,0 экв) добавляли соединение **11**. Раствор перемешивали в течение 16 ч и выпаривали в эфир. Осадок промывали тщательно CH₂Cl₂ до тех пор, пока в промывочном растворе не будет обнаруживаться свободное лекарство. После сушки в условиях глубокого вакуума получали соединение **20**.

В: Диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (8,5 мг, 0,024 ммол) и CDDC, **3** (30 мг, 0,024 ммол) растворяли в 1-метил-2-пиридиноне (2мл). Смесь перемешивали при 64°C в течение 4 дней и подвергали диализу с применением мембраны 10 000 MWCO в течение 2 дней. После лиофилизации получают белый порошок соединения **21** (3 мг).

Соединение **11** добавляют к раствору полимера **21** в DMSO в присутствии EDC (2 экв), NHS (1 экв) и DIEA (1,0 экв). Раствор перемешивали в течение 16 ч и затем осаждали в эфире. Осадок промывали CH₂Cl₂ до отсутствия в промывочной воде свободного лекарства. После сушки в условиях глубокого вакуума получают соединение **22**.

Пример 20: Синтез CDDC-Цис сополимера **23** и его конъюгата с CPT, **24**.

Схема XXX.



20 CCD **1** (141,3 мг, 0,1 ммоль) и цистин (24 мг, 0,1 ммоль) растворяли в сухом DMSO (0,3 мл) и пиридине (0,1 мл). Смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи при 72°C. Добавляли воду (10 мл). Осадок отфильтровывали и фильтрат подвергали диализу с применением мембраны 10 000 MWCO (Spectra/Por 7) в течение 48 часов. Получали

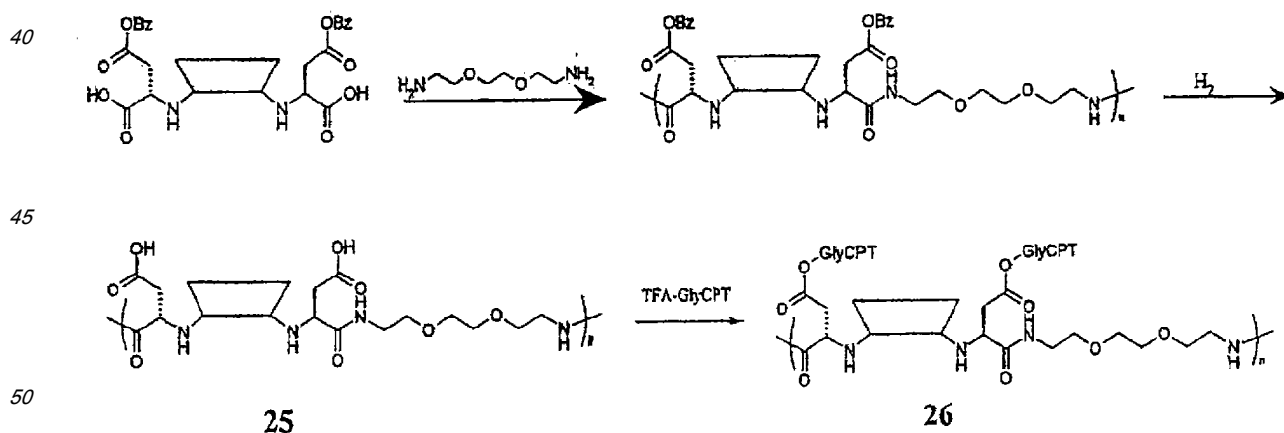
25 белый порошок соединения **23** (8 мг).

Соединение **11** смешивали в среде DMSO с соединением **23**. К раствору добавляли EDC (2 экв), NHS(1 экв) и DIEA (1,0 экв). Этот раствор перемешивали в течение 16 ч и

30 затем высаждали, выливая в эфир. Осадок промывали CH₂Cl₂ до отсутствия в промывочной воде свободного лекарства. После сушки в условиях глубокого вакуума получают соединение **24**.

35 **Пример 21:** Синтез CD-БисGlu-диамин сополимера **25** и его конъюгата с CPT, **26**.

Схема XXXI.

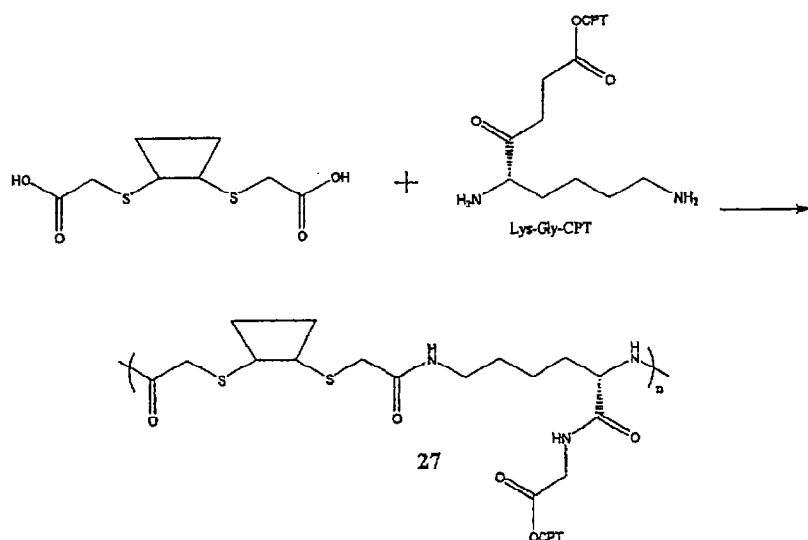


CD-бис(глутаминовой кислоты-γ-бензиловый эфир), **6**, и этиленгликоль-бис-этиламин растворяли в сухом DMSO. К раствору добавляли EDC (3 экв) и сульфо- NHS (2 экв). Раствор перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 2 дней. Затем раствор переносили на мембрану 10 000 MWCO и подвергали диализу в течение 48 часов. После лиофилизации получали белый порошок. Этот твёрдый продукт растворяли в смеси DMSO и метанола и обрабатывали водородом в присутствии катализатора 10% Pd/C. Раствор выливали в эфир для выделения продукта. После сушки в вакууме получали соединение **25**.

Соединение **11** смешивали с соединением **25** в растворе DMSO. К раствору добавляли EDC (2 экв), NHS (1 экв) и DIEA (1 экв). Раствор перемешивали в течение 16 ч и осаждали эфиром. Осадок промывали CH₂Cl₂ до исчезновения в промывочном растворе свободного лекарства. После сушки в глубоком вакууме получали соединение **26**.

Пример 22: Синтез CDDM-Lys(Gly CPT) полимера, **27**.

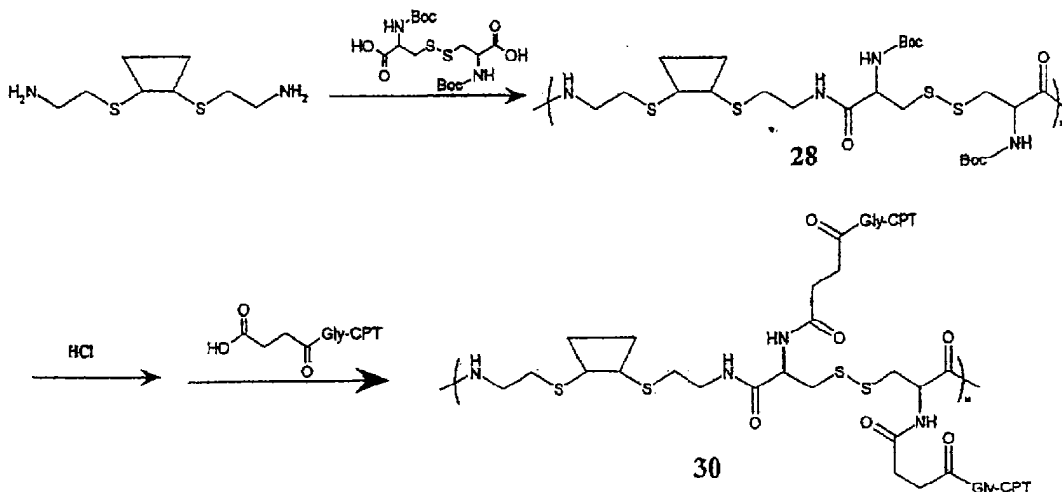
Схема XXXII.



В сухом DMSO растворяли CDDM, **5** и Lys-Gly-CPT, **14**. К смеси добавляли EDC (3 экв.) и сульфо-NHS (2 экв.). Раствор перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 2 дней. Затем раствор выливали в эфир. Осадок **27** сушили в вакууме.

Пример 23: Синтез сополимера CDDC-Цис(Вос), **28**, сополимера CDDC-Цис, **29** и его конъюгата с CPT, **30**..

Схема XXXIII.



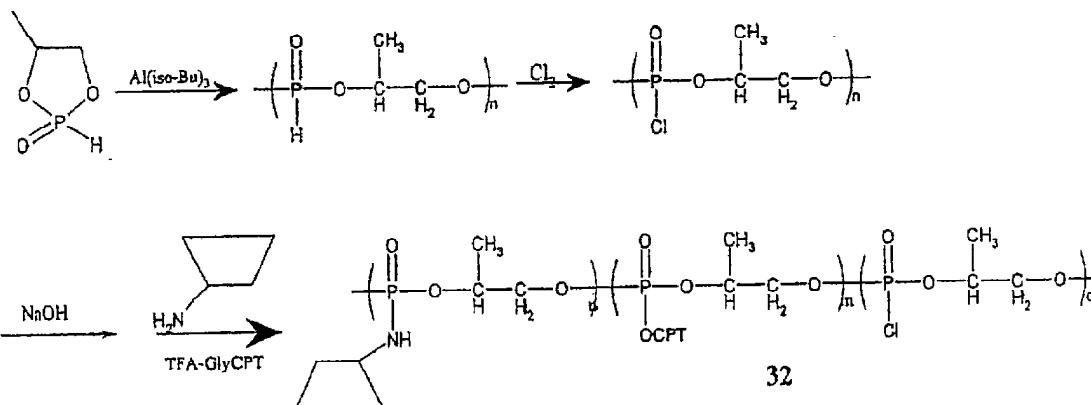
CDDC (3) и N,N-диВос-цистин растворяли в сухом DMSO. К смеси добавляли EDC (3 экв.) и сульфo-NHS (2 экв.). Раствор перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 2 дней. Затем раствор переносили на мембрану 10 000 MWCO и подвергали диализу в течение 48 часов. После лиофилизации получали белый порошок полимера CDDC-Цис(Вос), 28.

К порошку добавляли смесь HCl и DMSO. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1ч и подвергали диализу в течение 24 часов, используя мембрану 10 000 MWCO. Получали соединение 29 в виде белого твёрдого продукта.

Suc-Gly-CPT, 15, смешивали с соединением 29 в среде DMSO. К раствору добавляли EDC (2 экв.), NHS (1 экв.) и DIEA (1,0 экв.). Раствор перемешивали в течение 16 ч в атмосфере аргона и осаждали эфиром. Осадок промывали эфиром до тех пор, пока в промывочном растворе не перестанет обнаруживаться свободное лекарство. После сушки в условиях глубокого вакуума получали соединение 30.

Пример 24: Синтез биоразлагаемого полимера CD-полифосфозэфир, 31, и его конъюгатов с CPT, 32.

Схема XXXIV.

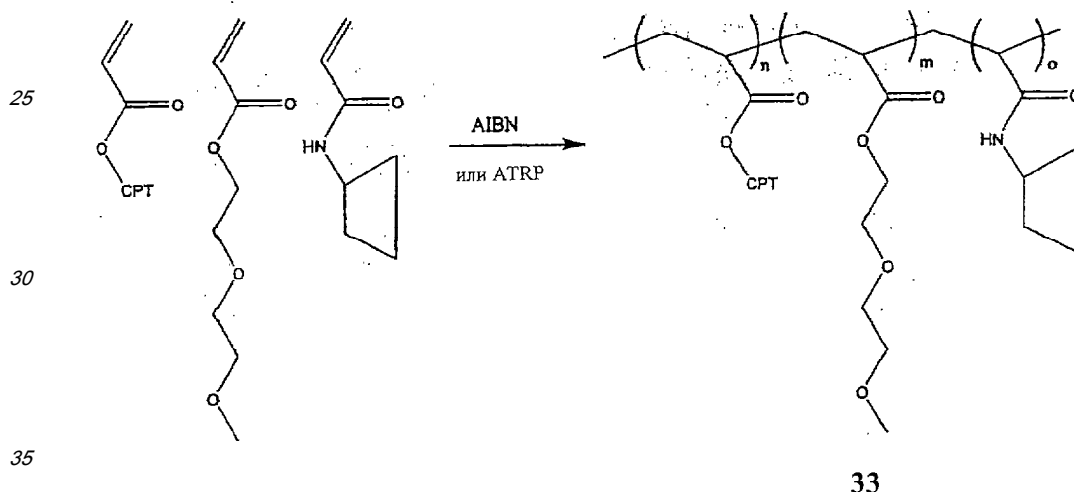


Синтез биоразлагаемого полифосфоэфира описан Wang J. et al., JACS, 2001, 123, 9480-9481.

Полифосфоэфир смешивали с 10 (0,5 экв повторяющейся единицы) в среде DMSO. К раствору добавляли EDC (2 экв.), NHS (1 экв.) и DIEA (1,0 экв.). Раствор перемешивали в течение 16 ч и затем осаждали эфиром. Полученный CD-поли-фосфоэфир, **31** растворяли в DMSO. К раствору добавляли соединение **11** (0,5 экв повторяющейся единицы), EDC (2 экв.), NHS (1 экв.) и DIEA (1,0 экв.). Раствор перемешивали в течение 16 ч и затем осаждали эфиром. Осадок промывали эфиром до исчезновения свободного лекарства в промывочном растворе. После сушки в глубоком вакууме получали соединение **32**.

Пример 25: Синтез CDСополимер-СРТ конъюгата, **33**, с основной полиэтиленовой цепью путём радикальной полимеризации.

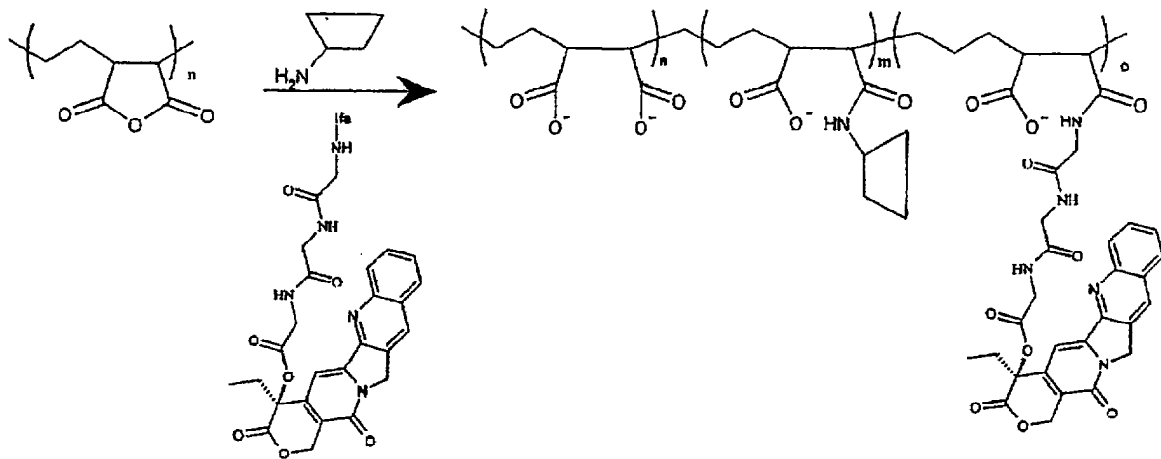
Схема XXXV.



Акриловые мономеры CPT, триэтиленгликольмонометилловый эфир и CD-моноцистамин могут быть синтезированы из N-акрилоксисукцинимид (Polysciences Inc.). Эти мономеры смешивали в отношении 1:1:1 в среде сухого DMSO. К смеси в атмосфере аргона добавляли AIBN. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24-48 ч до тех пор, пока раствор не станет вязким. Конъюгат полимер-СРТ, **33**, осаждали эфиром и сушили в вакууме.

Пример 26: Синтез конъюгата CD-привитой-поли(этилен-черед. малеиновый ангидрид)-GlyGlyGly-CPT конъюгата, **34**.

Схема XXXVI.

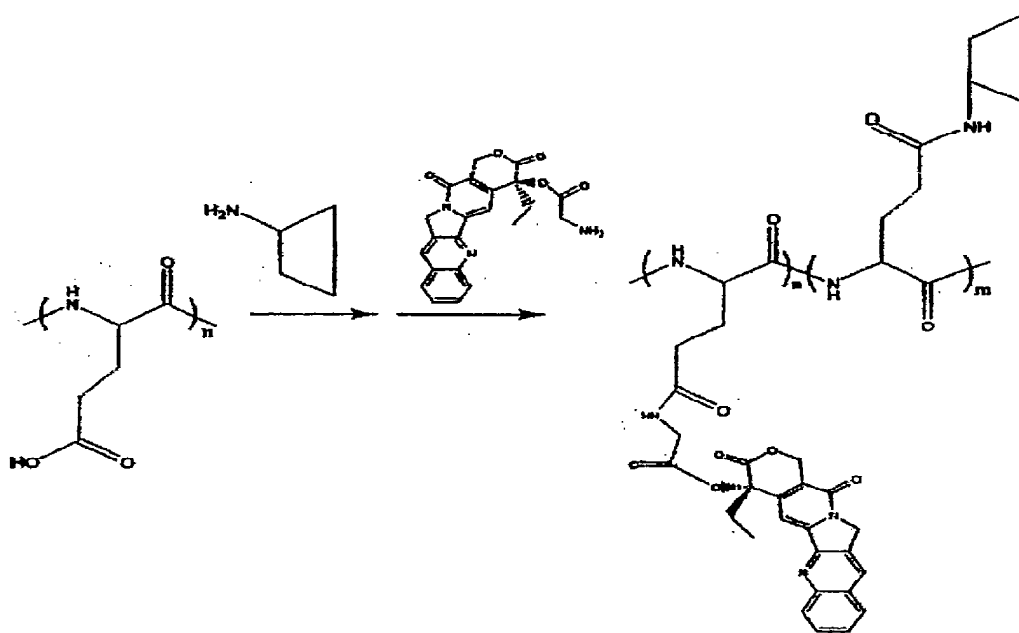


34

Поли(этилен-черед. малеиновый ангидрид) (Aldrich) растворяли в DMSO. Добавляли соединение 10 (0,4 экв повторяющейся единицы) и соединение 12 (0,4 экв повторяющейся единицы). Раствор нагревали при 70°C в течение 16 ч и затем осаждали эфиром. Полученный CD-привитой-поли(этилен-черед. малеиновый ангидрид)-GlyGlyGly-CPT, 34, сушат в условиях глубокого вакуума.

Пример 27: Синтез конъюгата полиглутамат-CD-CPT, 35.

Схема XXXVII.



35

Полиглутамат (Sigma-Aldrich) смешивали с соединением 10 (0,5 экв. повторяющейся единицы) и соединением 11 (0,5 экв. повторяющейся единицы) в среде DMSO. К раствору добавляли EDC (3 экв.), NHS (2 экв.) и DIEA (1 экв.). Раствор перемешивали в течение 16 ч и затем осаждали эфиром. После сушки в глубоком вакууме получали конъюгат полиглутамат-CD-CPT, 35.

Пример 28: Синтез и характеристики сополимеров CD-БисCys-Peg3400, **36** и их конъюгатов с СРТ, **37**.

А. Синтез и характеристики сополимеров CD-БисCys-Peg3400, **36**.

Схема XXXVIIIa.

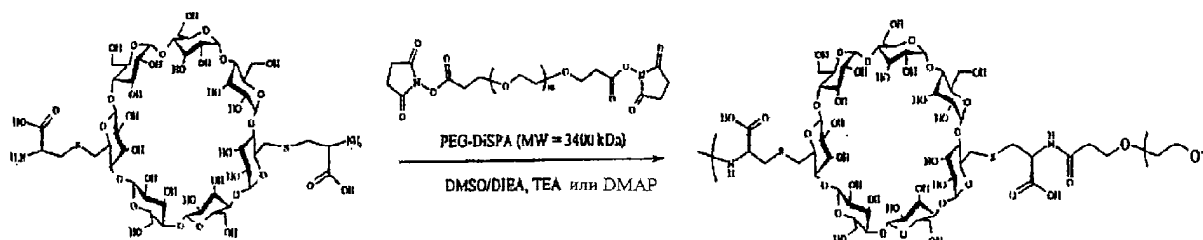
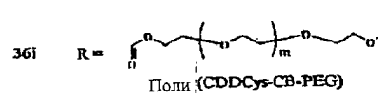
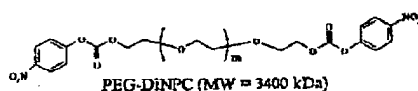
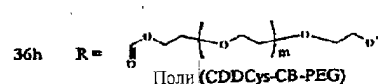
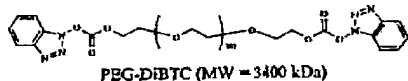
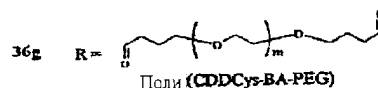
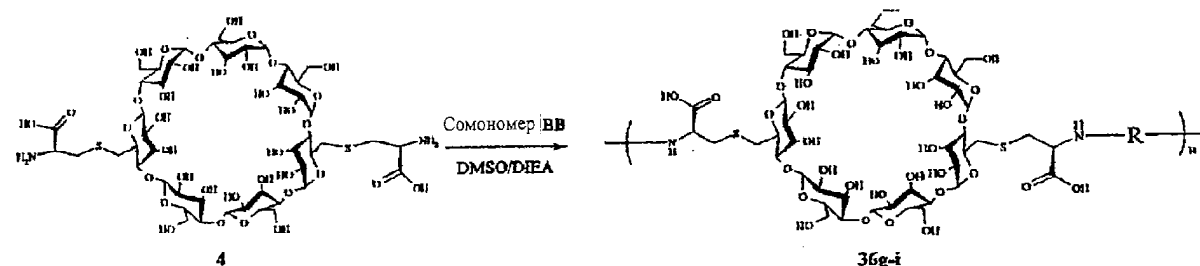


Схема XXXVIIIb.



Сокр.: BA = бутанонкамидная связь;
CB = карбаматная связь;

Синтез поли(CDDCys-PA-PEG), **36a.**

Соединение **4** (после осаждения ацетоном, 63 мг, 0,047 ммоль) и PEG-DiSPA (MW 3400, 160 мг, 0,047 ммоль) сушили в вакууме в течение 8 ч. К смеси в атмосфере аргона добавляли безводный DMSO (1,26 мл). После перемешивания в течение 10 минут в атмосфере аргона добавляли безводный диизопропилэтиламин (DIEA, 19 мкл, 2,3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона 120 ч. Раствор, содержащий полимер, подвергали диализу против воды в течение 48 часов на мембране 10 000 MWCO и после лиофилизации получали 196 мг соединения **36a** (90%, Таблица 1). $M_w = 57,4$ kDa,

$M_n = 41,7$ kDa, $M_w/M_n = 1,38$. ^1H ЯМР (D_2O) δ 5.08 (m, CD-2-H), 4.27 (m, Cys-CH), 2.72-3.76 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.44 (m, Cys-CH₂).

Синтез других полимеров поли(CDDCys-PA-PEG), (**36b-f**), поли(CDDCys-BA-PEG), (**36g**), поли(CDDCys-CB-PEG), (**36h-i**), проводили при условиях полимеризации, аналогичных условиям при получении соединения **36a**. Условия полимеризации, вид мономеров, молекулярные веса полимеров, полидисперсность и выход приведены в Таблице 1.

36g: ^1H ЯМР (D_2O) δ 5.10 (m, CD-2-H), 4.25-4.37 (m, Cys-CH), 2.72-3.86 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.21 (m, Cys-CH₂). **36h-i**: ^1H ЯМР (D_2O) δ 5.05 (m, CD-2-H), 4.56 (m, Cys-CH), 2.70-3.93 (m, CD-3,4,5,6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.38 (m, -OCH₂CH₂CH₂C(O)-NH-), 2.34 (m, Cys-CH₂), 1.90 (m, -OCH₂CH₂CH₂C(O)-NH-).

Добавление ненуклеофильного органического основания (такого как DIEA) было важным при осуществлении процесса полимеризации, так как через 48 ч, если это основание не добавляли, не наблюдалось изменений вязкости растворов. Когда добавляли 2,3 экв DIEA, вязкость раствора при полимеризации резко увеличивалась через 4-6 ч. DIEA депротонирует аминогруппы соединения **4**, делая их более нуклеофильными для сочетания с PEG-DiSPA. Если добавляли другие основания, такие как TEA или DMAP (**36b-c**, Таблица 1), различий в ходе процесса полимеризации не наблюдалось. Полимеры, полученные с использованием соединения **4**, выделенные двумя различными методами осаждения (ацетон и метанол), имели разные молекулярные веса. Применение соединения **4**, которое очищали осаждением метанолом (не содержит свободного цистеина), обеспечивало получение полимера с более высоким молекулярным весом (**36d-e**) по сравнению с менее чистым соединением **4**, которое было получено осаждением ацетоном (**36a**). Полимеризация соединения **4**, с PEG-DiSPA обычно приводила к получению полимеров с выходом более 90%.

Соединение **4** полимеризовали с другими активированными мономерами, такими как PEG-DiSBA, PEG-DiBTC и PEG-DiNPC. Реакция **4** с PEG-DiSBA приводила к получению полимера **36g** с теми же связями, что и у **36a-f** (амидная связь, но ещё одна группа -CH₂ по сравнению с **36a-f** у линкера) с M_w более 100 кДа, а реакция **4** с PEG-DiBTC и PEG-DiNPC приводила к получению полимера **36h** и **36i**, соответственно, с соединительным карбаматным звеном и M_w более 50 кДа (Таблица 1).

Таблица 1. Полимеризация соединения 4 с дифункционализированным PEG.

CDP	PEG	Основание полимеризации	Время полимеризации (ч)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n	Выход (%)
	Сомономер						
36a ^a	PEG-DiSPA	DIEA	120	57.4	41.7	1.38	90
36b ^a	PEG-DiSPA	DMAP	120	54.2	38.1	1.42	91
36c ^a	PEG-DiSPA	TEA	120	57.4	42.6	1.35	91
36d ^b	PEG-DiSPA	DIEA	120	93.6	58.0	1.48	96
36e ^b	PEG-DiSPA	DIEA	144	97.3	58.0	1.67	94
36f ^b	PEG-DiSPA	DIEA	2	35.3	25.6	1.38	95
36g	PEG-DiSBA	DIEA	120	114.7	77.9	1.47	96
36h	PEG-DiBTC	DIEA	120	67.6	39.4	1.47	95
36i	PEG-DiNPC	DIEA	120	86.5	57.2	1.51	96

^a 4 промывали ацетоном до полимеризации

^b 4 промывали метанолом до полимеризации

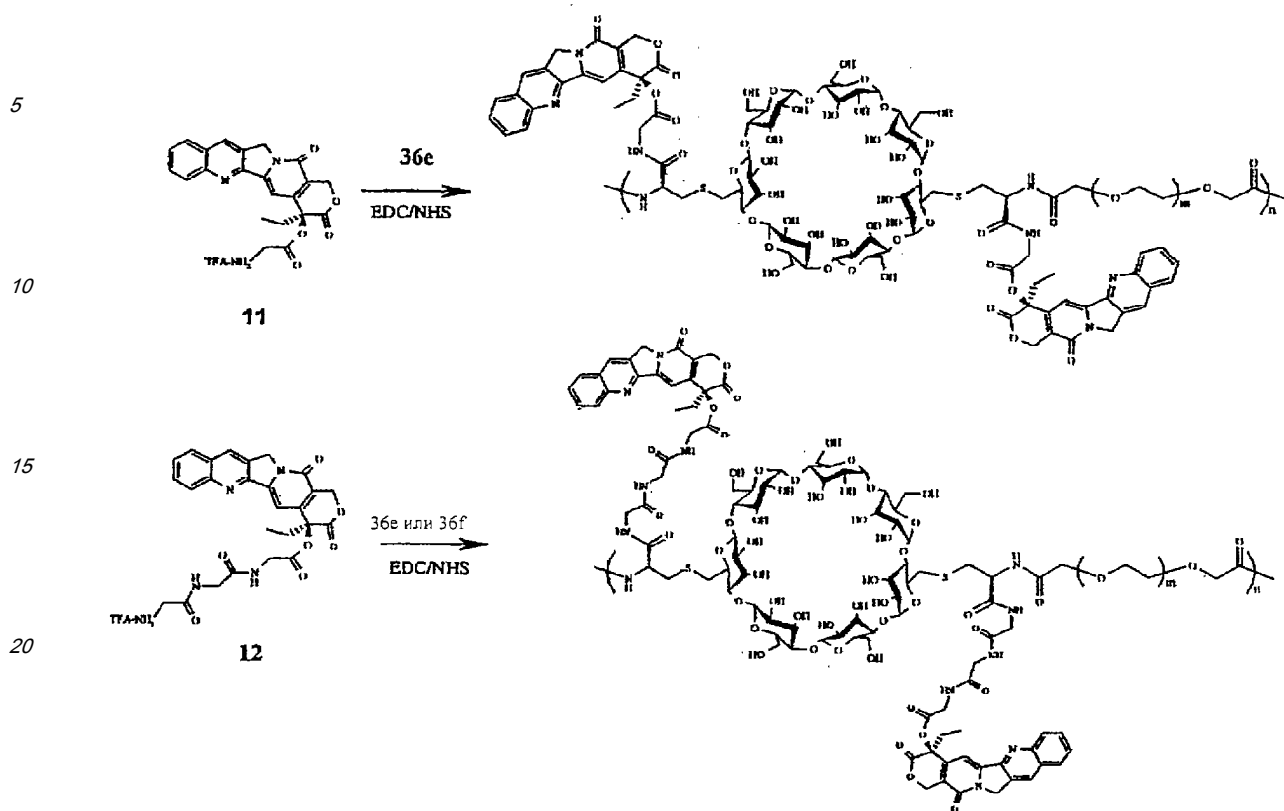
Полимеры **36a-i** хорошо растворимы в водном растворе. Они могут легко растворяться в воде или в растворе фосфатного буфера при концентрациях, по меньшей мере, 200 мг/мл. Растворимость этих полимеров в водном растворе при концентрациях, превышающих 200 мг/мл, не определялась из-за высокой вязкости. Эти полимеры растворимы также в DMF, DMSO и метаноле, слегка растворимы в CH₃CN и CHCl₃, но не растворяются в THF и этиловом эфире.

Контроль молекулярного веса CD полимеров. Соединение **4** (после осаждения метанолом) (56,2 мг, 0,0419 ммол) и PEG-DiSPA (147 мг, 0,0419 ммол) высушивали под вакуумом в течение 4-8 ч. К этой смеси добавляли сухой DMSO (1,1 мл) в атмосфере аргона. После перемешивания в течение 10 минут в атмосфере аргона добавляли DIEA (16 мкл, 2,2 экв.). Часть полимеризационного раствора (150 мкл) удаляли и осаждали эфиром через выбранные интервалы времени (2 ч, 18 ч, 43 ч, 70 ч, 168 ч и 288 ч). Молекулярные веса осаждённых полимеров определяли, как описано выше.

Как показано на Фиг. 5a и 5b, молекулярные веса полимера **36** можно регулировать меняя время полимеризации.

В. Синтез конъюгатов поли(CDDCys-PA-PEG)-CPT (HGGG6, LGGG10, HG6, HGGG10).

Схема XXXIX.



Синтез поли(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly (**HGGG6**). Соединение **36e** (1,37 г, 0,30 ммол повторяющейся единицы) растворяли в сухом DMSO (136 мл). Смесь перемешивали в течение 10 минут. Соединение **12** (419 мг, 0,712 ммол, 2,36 экв), DIEA (0,092 мл, 0,712 ммол, 2,36 экв), EDC (172 мг, 0,903 ммол, 3,0 экв) и NHS (76 мг, 0,662 ммол, 2,2 экв) добавляли к раствору полимера и перемешивали в течение примерно 15 ч. Полимер осаждали этиловым эфиром (1 л). Эфир выливали в раствор и промывали осадок CH_3CN (3 x 100 мл). Осадок растворяли в 600 мл воды. Нерастворимый твёрдый продукт отфильтровывали через фильтры 0,2 мкм. Раствор подвергали диализу с применением мембраны 25 000 MWCO (Spectra/Por7) в течение 10 ч при 10-15°C в воде DI. Диализную воду меняли каждые 60 минут. Раствор конъюгата полимер-лекарство стерилизовали пропусканием его через фильтры 0,2 мкм. Раствор подвергали лиофилизации с получением твёрдого продукта жёлтого цвета **HGGG6** (1,42 г, выход 85%).

Синтез поли(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (**LGGG10**). Образование конъюгата соединений **12** и **36f** осуществляли способом, аналогичным использованному для получения **HGGG6**, за исключением того, что этот конъюгат подвергали диализу на мембране 10 000 MWCO (Spectra/Por 7) вместо мембраны 25 000 MWCO. Выход **LGGG10** составил 83%.

Синтез поли(CDDCys-PA-PEG)-Gly-CPT (**HG6**). Получение конъюгата соединений **11** и **36e** осуществляли способом, аналогичным использованному для получения **HGGG6**. Выход **HG6** составил 83%.

Синтез поли(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (**HGGG10**). Соединение **36e** (1,5 г, 0,33 ммол повторяющейся единицы) растворяли в сухом DMSO (150 мл). Смесь перемешивали в течение 10 минут. К раствору полимера добавляли соединение **12** (941 мг, 1,49 ммол, 4,5 экв), DIEA (0,258 мл, 1,49 ммол, 4,5 экв), EDC (283 мг, 1,49 ммол, 4,5 экв) и NHS (113 мг, 0,99 ммол, 3 экв) и перемешивали в течение примерно 24 ч. К раствору конъюгата добавляли другую порцию EDC (142 мг, 0,75 ммол, 2,3 экв) и NHS (56 мг, 0,5 ммол, 1,5 экв). Полимер перемешивали в течение 22 ч. Обработку проводили, как в случае получения **HGGG6**. Выход **HGGG10** составил 77%.

Определение количества (в вес.%) CPT в конъюгатах. Растворы **HGGG6**, **LGGG10**, **HG6** и **HGGG10** готовили с концентрацией 10 мг/мл DMSO. Аликвоту соответствующего раствора разбавляли до 100 мкг/мл, используя 1N NaOH. CPT полностью гидролизировался в этом основном растворе и превращался в карбоксилатную форму в течение 2 ч при комнатной температуре. Аликвоту этого раствора разбавляли до 10 мкг/мл, используя 8,5%-ную H_3PO_4 и карбоксилатную форму CPT превращали в лактонную форму. 30 мкл этого раствора подвергали ЖХВР. Пик от лактонной формы CPT интегрировали и сравнивали со стандартной кривой.

Получали конъюгаты соединения **11** и **12** и **36e** или **36f** (Таблица 2), используя обычные методы сочетания. Вследствие нестабильности эфирного линкера в соединениях **11** и **12** в водном растворе сочетание проводили в безводном DMSO в атмосфере аргона. Для депротонирования солей TFA и соединений **11** и **12** и облегчения сочетания требовалось органическое основание. Для полимерного конъюгата с соединением **12** содержание лекарства (вес.%) составляло примерно 6-10%. Теоретическое максимальное содержание лекарства равно примерно 13% при использовании PEG с молекулярным весом 3400 Да; максимальные величины могут быть увеличены путём снижения молекулярного веса PEG сегментов. Растворимость всех конъюгатов в воде или PBS составляла более 200 мг/мл (эквивалентно 12-20 мг CPT/мл для содержания лекарства, равного 6-10 вес.%, соответственно). Подробное описание свойств **HGGG6**, **LGGG10**, **HG6** и **HGGG10** приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Свойства конъюгатов полимер – СРТ.

Конъюгат ^a	M _w родительског о полимера ($\times 10^{-3}$)	M _w /M _n ^b	Линкер	СРТ (вес.%)
HGGG6,	97	1,7	триглицин	6,1
LGGG10,	35	1,6	триглицин	10,2
HG6	97	1,7	глицин	6,8
HGGG10	97	1,7	триглицин	9,6

^a Сокращения: Н= высокий M_w полимера (97 кДа), L= низкий M_w полимера (35 кДа), GGG = линкер триглицина, G = глициновый линкер, 6 = содержание лекарства около 6 вес.%, 10 = содержание лекарства около 10 вес.%;

^b Полидисперсность полимера, измеренная методом светорассеяния (26).

С. Высвобождение СРТ из HGGG6 и HG6.

Высвобождение СРТ в PBS. HGGG6 и HG6 использовали для получения раствора в PBS концентрацией 1 мг/мл (1х, pH 7,4). 100 мл аликвоту раствора помещали в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл и выдерживали при 37°C. Образцы прекращали инкубировать в выбранный момент времени и хранили при –80°C до начала анализа. Каждый раствор разбавляли 8,5%-ным H₃PO₄ до 5 мл в волюметрической колбе. 30 мл такого раствора подвергали ЖХВР. Интегрировали пик лактонной формы СРТ и сравнивали со стандартной кривой.

Определение высвобождения СРТ из HGGG6 и HG6 в PBS, содержащем ацетилхолинэстеразу (эстераза, 100 ед/мл), в буферном KH₂PO₄ (pH 6,1, 0,1M) и в буферном KH₂PO₄ (pH 6,1, 0,1M), содержащем катепсин В (цистеинпротеиназа, 200 мкМ, преактивированная на льду в течение 30 минут в этом буфере, содержащем 2 мМ DTT и 1 мМ EDTA), осуществляли методом, описанным выше для одного PBS.

Высвобождение СРТ в плазме человека. Аликвоту бульона HGGG6 и HG6 разбавляли до конечной концентрации 0,5 мг/мл в PBS (1х, pH 7,4). Затем раствор добавляли к лиофилизированному порошку плазмы человека для воссоздания 100% плазмы человека в рекомендуемом количестве. Раствор делили на равные объемы (250 мкл) и помещали в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл, инкубировали при 37°C и останавливали инкубацию в выбранный момент времени. Образцы хранили при –80°C до

анализа. Их отделяли от плазмы в колонках твёрдофазной экстракции. Картридж твёрдофазной экстракции (Oasis HLB, 1 см³, Waters) перед загрузкой предварительно обрабатывали 1 мл ацетонитрила и затем 1 мл 8,5%-ной H₃PO₄. Образцы подкисляли равными объёмами 8,5%-ной H₃PO₄ до загрузки. После загрузки подкисленного раствора в картридж слой промывали 3х1мл воды. Высвободившийся СРТ и полимерный конъюгат элюировали 3х1 мл смеси ацетонитрила и буфера фосфата калия (рН 4,1) (60/40 об/об). Элюирующий раствор разбавляли до 5 мл в волуметрической колбе объёмом 5 мл. 30 мл этого раствора подвергали ЖХВР. Интегрировали пик лактонной формы СРТ и сравнивали со стандартной кривой.

Высвобождение СРТ из **HGGG6** и **HG6** в PBS, содержащем 4% плазмы (PBS/воссозданный раствор плазмы человека = 96/4 об/об), в плазме мыши и в воссозданном альбумине человека (PBS раствором) изучали методом, аналогичным описанному выше для чистой плазмы. В PBS (1х, рН 7,4) полупериод выделения (t_{1/2}) при высвобождении СРТ из **HG6** и **HGGG6** составлял 59 ч и 32 ч, соответственно. Полупериод выделения уменьшался до 25 ч и 22 ч, соответственно, в присутствии 4% плазмы человека и до 1,7 ч и 1,6 ч, соответственно, в 100% плазме человека («HP») и до 2,6 ч и 2,2 ч, соответственно, в 100% плазме мыши («MP»). Скорость высвобождения СРТ из **HGGG6** и **HG6** в присутствии альбумина («Alb») или ацетилхолинэстеразы («Ac Cho») была того же порядка, что и в PBS. В буферном растворе при рН ниже, чем у PBS (рН 6,1) с ферментом катепсином В (активным при рН 6,1) или без него как из **HG6**, так и из **HGGG6** выделялось менее 50% всего связанного СРТ в течение 144 часов. (Таблица 3).

Таблица 3. Полупериод выделения(t_{1/2} в ч) СРТ из **HG6** и **HGGG6**^a.

Конъюгат	PBS ^b	4% HP ^c	HP ^d	MP ^e	Alb ^f	Ac Cho ^g	рН 6.1 буфер ^h	кат В (рН 6,1) ⁱ
HG6	59	25	1,7	2,6	62	33	>144	>144
HGGG6	32	22	1,6	2,2	73	43	>144	>144

^a t_{1/2} обозначает время (ч) высвобождения половины связанного СРТ;

Сокращения: HP обозначает плазму человека, MP обозначает плазму мыши.

^b рН 7,4 PBS 1х буфер;

^c Воссозданная плазма человека, смешанная с PBS (об/об = 4/96);

^d Воссозданная плазма человека.

^e Свежая плазма мыши.

^f В буферном (PBS) растворе воссозданного альбумина человека.

^g В присутствии PBS раствора ацетилхолинэстеразы (100 ед/мл).

^h рН 6.1, фосфатный буфер (0,1M).

ⁱ рН 6.1, фосфатный буфер в присутствии катепсина В.

5

Высвобождение СРТ в раствор при разных значениях рН. Готовили растворы **HGGG6** и **HG6** в буферном растворе с концентрацией 1 мг/мл со значениями рН от кислого (рН 1,2) до основного (рН 13,1) и инкубировали их при 37°C в течение 24 ч. Аликвоту каждого раствора разбавляли 8,5%-ной H₃PO₄ до концентрации примерно 100 мкг/мл. 30 мкл каждого раствора подвергали ЖХВР. Интегрировали пик лактонной формы СРТ и сравнивали со стандартной кривой.

10

15

рН водного раствора оказывает значительное влияние на скорость высвобождения СРТ из **HG6** и **HGGG6**. Количество СРТ, высвободившегося из **HG6** и **HGGG6** при 37°C через 24 ч в буферном растворе со значениями рН от 1,1 до 13,1 показаны на Фиг. 6. Глицинил-СРТ эфирные связи в **HG6** и **HGGG6** были очень стабильными при кислом рН (1,1-6,4), так как за 24 часа высвободилось менее 7% СРТ.

20

25

Определение IC₅₀ путём ММТ анализа. Клеточная линия A2780 карциномы яичника человека была получена в European Collection of Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, UK). Клеточные линии колоректальной аденомы человека HT29, карциномы PC-3 простаты человека и аденокарциномы толстой кишки LS174T получали из American Type Cultures Collection (Rockville, MD). Клетки высевали в планшеты с 96 лунками с плотностью 5000 клеток/лунку и выращивали в среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C в течение 24 ч во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Среду заменяли свежей средой, содержащей СРТ, соединение **36e**, **HGGG6** или **HG6**, с концентрацией от 1 нМ до 10 мкМ СРТ и **36e** (эквивалент СРТ для **HGGG6** и **HG6**). При каждой концентрации обрабатывали три лунки на планшете. Действие соединений на рост клеток определяли методом МТТ-анализа через 72 ч. Среду удаляли, клетки промывали PBS, МТТ раствор добавляли с концентрацией 0,5 мг/мл, и планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Среду удаляли и кристаллы формазана солибилизировали в DMSO. Абсорбцию измеряли при длине волны 560 нм, используя прибор SPECTRAFluor со считывающим устройством (Tecan, Durham, NC). Количество выживших клеток определяли по отношению к необработанным клеткам и определяли величину IC₅₀ по кривым зависимости количества выживших клеток от дозы. Величины IC₅₀, СРТ, **36e**, **HGGG6** и **HG6** приведены в Таблице 4.

30

35

40

45

50

Таблица 4. Величины IC₅₀, CPT, неконъюгированного полимера **36e** и конъюгатов CPT и **HG6** и **HGGG6** в различных клеточных линиях.

Клеточная линия	36e (мкМ)	CPT (мкМ)	HG6 (мкМ)	HGGG6 (мкМ)
LS174T	>300	0.005	0.050	0.010
HT29	300	0.020	0.050	0.030
A2780	100	0.007	0.025	0.020
PC3	>300	0.075	0.25	0.15

Пример 29: Поли-CD-БисCys-Peg3400-Ala-CPT, **37**.

Соединение **36e** (54 мг, 0,012 ммол повторяющейся единицы) растворяли в сухом DMSO (226 мл) и перемешивали в течение 10 минут. К раствору полимера добавляли TFA-Ala-CPT, полученный способом, аналогичным при получении соединения **11** (15 мг, 0,028 ммол, 2,36 экв.), DIEA (4,88 мл, 0,028 ммол, 2,36 экв.), DCC (24,52 мг 0,12 ммол, 10 экв.) и NHS (13,6 мг, 0,12 ммол, 10 экв.). Смесь перемешивали в течение примерно 16 ч. Полимер осаждали эфиром (40 мл) и промывали эфиром (2 x 30 мл) и CH₃CN (2 x 10 мл). Затем его растворяли в водном растворе (10 мл) при pH 4 и подвергали диализу при комнатной температуре в течение 48 ч, используя мембрану 25 000 MWCO. Затем раствор пропускали через стерилизованный фильтр 0,2 мкм и подвергали лиофилизации с получением соединения **37** (46 мг, 85%). Содержание лекарства равно 5,5% по данным ЖХВР с использованием детектора флуоресценции после высвобождения CPT из соединения **37** с использованием основания. В соединении **37** содержание свободного CPT < 1%.

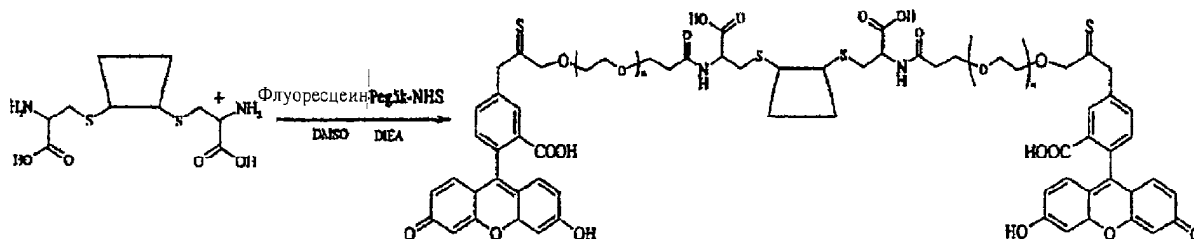
Пример 30: Поли-CD-БисCys-Peg3400-Leu-CPT, **38**.

Соединение **36e** (54 мг, 0,012 ммол повторяющейся единицы) растворяли в сухом DMSO (226 мл) и перемешивали в течение 10 минут. К раствору полимера добавляли TFA-Leu-CPT, который получали аналогично соединению **11** (16 мг, 0,028 ммол, 2,36 экв.), DIEA (4,88 мл, 0,028 ммол, 2,36 экв.), DCC (24,52 мг 0,12 ммол, 10 экв.) и NHS (13,6 мг, 0,12 ммол, 10 экв.). Смесь перемешивали в течение примерно 16 ч. Полимер осаждали эфиром (40 мл) и промывали эфиром (2 x 30 мл) и CH₃CN (2 x 10 мл). Затем его растворяли в водном растворе (10 мл) при pH 4 и подвергали диализу при комнатной температуре в течение 48 ч, используя мембрану 25000 MWCO. Затем раствор пропускали через стерилизованный фильтр 0,2 мкм и подвергали лиофилизации с получением

соединения **38** (42 мг, 78%). Содержание лекарства по данным ЖХВР с использованием детектора флуоресценции после высвобождения СРТ из соединения **38** с применением основания составило 5%. Содержание свободного СРТ в соединении **38** < 1%.

Пример 31: Синтез CD-БисCys-БисPeg-FITC, 39.

Схема XXXX.

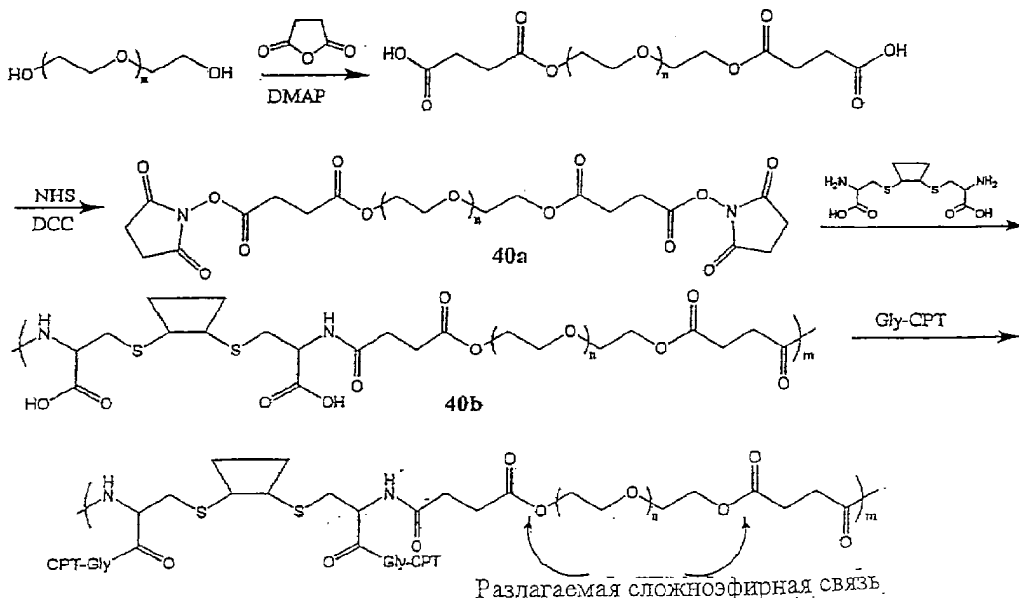


39

Соединение **4** (25 мг, 0,0186 ммол) и FITC-Peg5000-NHS (Shearwater, 186 мг, 0,0373 ммол) растворяли в сухом DMSO (2 мл). К смеси добавляли DIEA (0,0094 мл, 0,056 ммол, 3 экв.). Смесь держали в темноте и перемешивали в течение 24 ч. Затем добавляли воду (10 мл) и раствор подвергали диализу, используя мембрану 10 000 MWCO, в течение примерно 48 ч. После лиофилизации получали жёлтый продукт - полимер, **39**. Полимер характеризовали МС и ^1H ЯМР.

Пример 32: Синтез бис-сукцинимидил-сукцинат-Peg3400 (Бис-SS-PEG) (**40a**) и биоразлагаемого CD-БисCys-SS-Peg3400, **40b** и его конъюгата **41** и CPT.

Схема XXXXI



41

В круглодонную колбу объёмом 100 мл, снабжённую магнитной мешалкой и перегородкой, загружали 10 г (2,99 ммол) полиэтиленгликоля с M_w , равным 3350, 2,0 г (20 ммол) янтарного ангидрида и 50 мл безводного пиридина. После перемешивания раствора при 50°C в течение 16 ч растворитель удаляли в роторном испарителе. Остаток растворяли в 30 мл воды и экстрагировали 10 мл хлороформа 3 раза. Органический слой сушили над $MgSO_4$ и отфильтровывали. Затем растворитель концентрировали и высаждали в диэтиловый эфир. Получали 9,6 г бис-сукцинамидил-Peg3400 с выходом 90,6%. Продукт анализировали методом ЖХВР с обращённой фазой.

В круглодонную колбу объёмом 100 мл, снабжённую магнитной мешалкой и перегородкой, загружали 2 г (0,56 ммол) бис-сукцинамидил-Peg3400 и 10 мл безводного дихлорметана. К этому раствору добавляли 0,324 г (2,82 ммол) N-гидроксилсукцинимид. Раствор охлаждали на ледяной бане и добавляли 0,58 г (2,82 ммол) 1,3-дициклогексилкарбодиимида. После выдержки раствора при комнатной температуре в течение 24 ч его отфильтровывали и осаждали в 150 мл диэтилового эфира. Растворение в 10 мл дихлорметана и осаждение в диэтиловом эфире повторяли 2 раза. Получали 1,74 г (82,9%) Бис-SS-PEG, (40a). этот продукт анализировали методом ЖХВР с обращённой фазой.

Полимер CD-БисCys-SS-Peg3400, 40b.

В колбу в форме гранулы объёмом 50 мл загружали 100 мг (0,0746 ммол) соединения 4 и 254 мг (0,0746 ммол) соединения 40a. Соединённые твёрдые продукты сушили под вакуумом в течение 24 ч перед добавлением 1 мл безводного DMSO и 2,2 экв (0,164 ммол) DIEA. Раствор перемешивали 3 дня при комнатной температуре и осаждали полимер диэтиловым эфиром. Получали 100% 40b. Молекулярный вес определяли на системе Hitachi методом ЖХВР с использованием детектора Anspres RI, прецизионных детекторов DLS и колонки Progel-TSK G3000PWXL, элюантом служил 0,1M PBS при скорости истечения 0,7 мл/мин. M_w равен 93 000, M_n равен 61 000 и $M_w/M_n = 1,5$.

Конъюгат CD-БисCys-SS-Peg3400-GlyGlyGly-CPT, 41.

Соединение 40b (201,8 мг, 0,044 ммол повторяющейся единицы), TFA-GlyGlyGly-CPT, 12, (66 мг, 0,105 ммол, 2,36 экв.), EDC (25,5 мг, 0,133 ммол, 3 экв.) и NHS (11 мг, 0,0977 ммол, 2 экв.) растворяли в сухом DMSO (6 мл) и перемешивали в течение 30 минут. К полимерному раствору добавляли DIEA (19 мкл, 0,105 ммол, 2,36 экв.). Смесь перемешивали в течение примерно 41 ч. Полимер выделяли диэтиловым эфиром (250 мл) и промывали ацетонитрилом (3 x 25 мл). Затем его растворяли в воде с pH 4,0 (10 мг/мл) и подвергали диализу при комнатной температуре в течение 24 ч, используя мембрану 10

000 MWCO. Раствор затем пропускали через стерилизованный фильтр 0,2 мкм и затем подвергали лиофилизации с получением соединения **41** (128 мг, 52%). Содержание лекарства после высвобождения СРТ из соединения **41** с применением основания равно 6,95% по данным ЖХВР с использованием детектора флуоресценции. Гидролиз

соединения **41** проводили в плазме человека (100% раствор) при концентрации 1 мг/мл. Аликвоты растворов (100 мкл) помещали в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл и инкубировали при температуре водяной бани, равной 37°C. Затем образцы подкисляли 100 мкл 8,5%-ной H_3PO_4 и помещали в картридж твердофазной экстракции. Элюирование осуществляли смесью 60:40 (об/об) ацетонитрил/ KH_2PO_4 . Наличие свободного СРТ (лактонная форма) определяли на установке ЖХВР/детектор флуоресценции с применением смеси ацетонитрил/буфер KH_2PO_4 . Полупериод высвобождения равен 3 ч.

Разложение полимера CD-БисCys-SS-Peg3400, 40b.

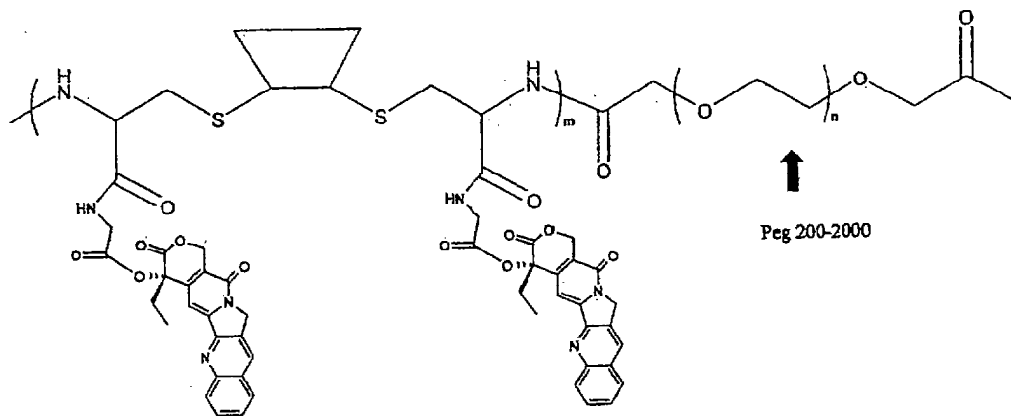
Раствор соединения **40b** с концентрацией 50 мг/мл готовили в плазме человека, восстановленной раствором PBS (pH 7,4). Аликвоты 100 мкл инкубировали при температуре 37°C. Каждую пробирку с образцом вынимали в выбранный момент времени и выделяли соединение в 900 мкл холодного метанола. Раствор центрифугировали и надосадочную жидкость анализировали на детекторе ЖХВР/ELC. Полученные спектры показаны на Фиг. 7.

Методы увеличения содержания лекарства.

Метод I. Синтез сополимера CD-БисCys-Peg с Peg с молекулами небольшой длины и его конъюгат Gly-CPT.

Пример 33: Синтез CD-БисCys-Peg (PEG с молекулами небольшой длины, например, Peg200-Peg2000) и его конъюгат с СРТ, **42**.

Схема XXXXII.



5

10

Схема XXXXIII.



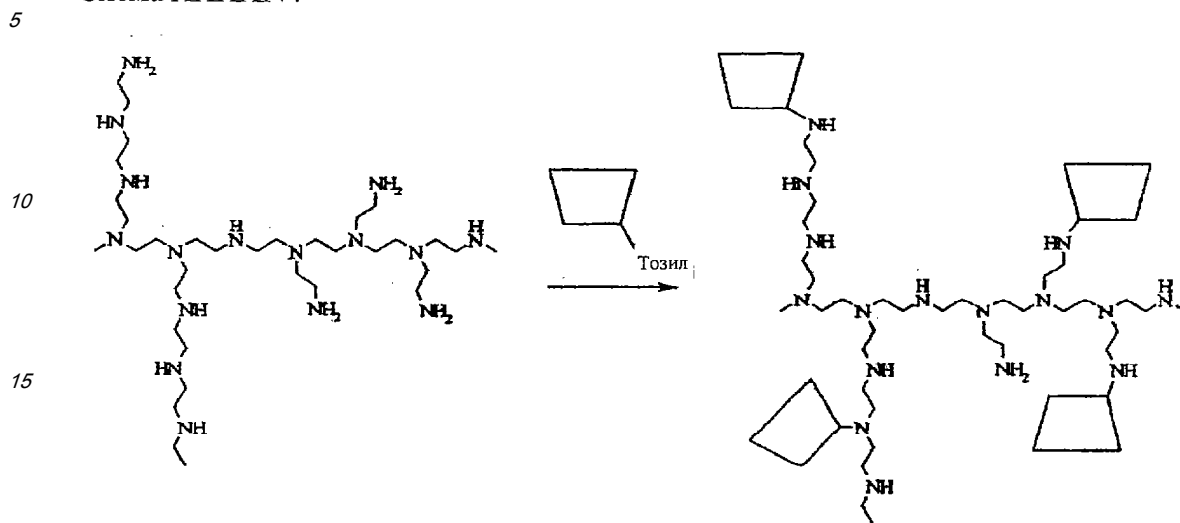
43

45

Пример 35: Синтез конъюгата PEI-CD-CPT, 44 (разветвлённый CD полимер с CPT).

А: Синтез разветвлённого полимера PEI-циклодекстрина.

Схема XXXXIV.



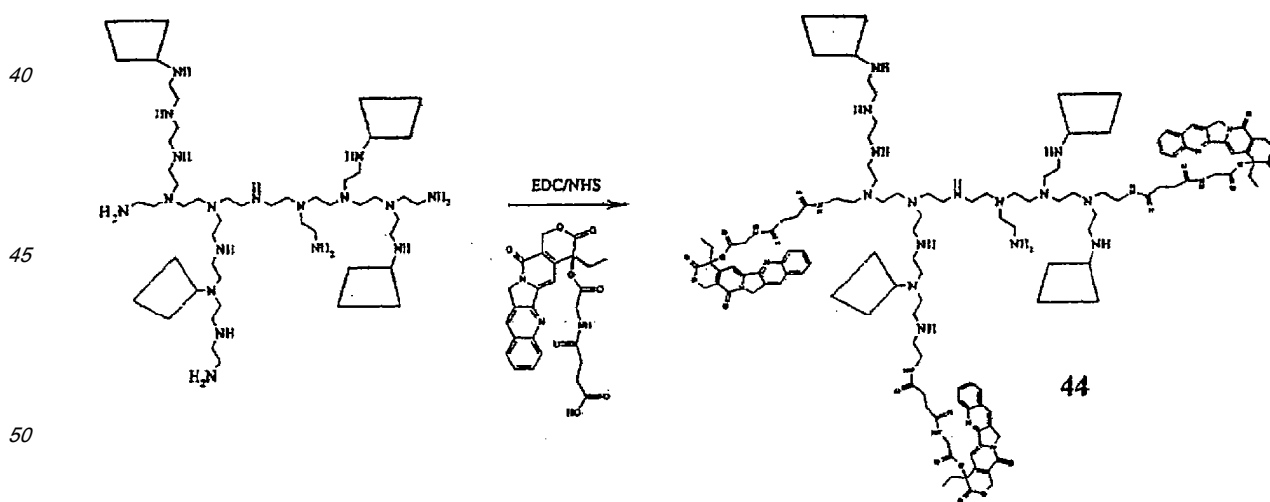
20 PEI (29 мг, Aldrich, M_w 25 000) растворяли в сухом DMSO (2 мл). Монотозилат циклодекстрина (448 мг, Cyclodextrin Technologies Development, Inc.) добавляли к раствору в атмосфере азота. После перемешивания смеси при 70°C в течение примерно 1

25 ч мутный раствор становился прозрачным. Этот раствор стал слегка жёлтым после выдержки при этой температуре в течение 48 ч в атмосфере азота.

30 Раствор переносили на мембрану 10 000 Spectra/Por MWCO и подвергали диализу против воды в течение 4 дней. Затем путём лиофилизации удаляли воду. После лиофилизации раствора получали белый порошок (120-140 мг). Отношение циклодекстрин/PEI определяли на основе интеграции протонов ^1H ЯМР.

В: Синтез конъюгата разветвлённого полимера PEI-CD-CPT.

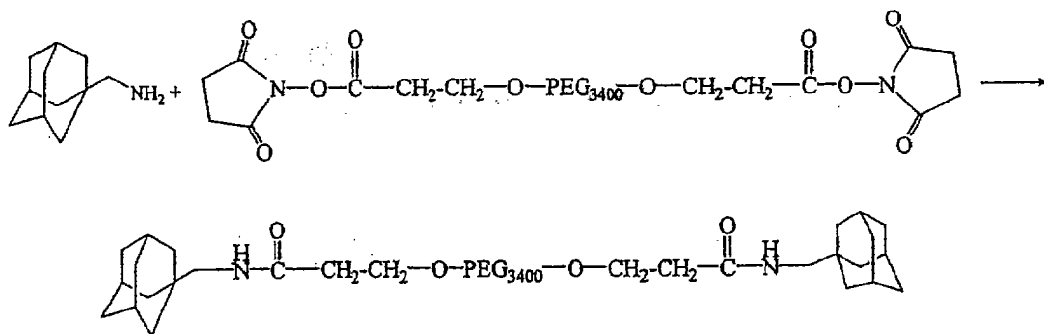
Схема XXXXV.



PEI-CD и Suc-Gly-CPT, **15**, (1,0 экв) растворяли в DMSO К раствору добавляли EDC (3 экв.), NHS (2,2 экв.) и DIEA (1 экв.). PEI-CD-Gly-CPT, **44**, осаждали эфиром, тщательно промывали этим растворителем и сушили в условиях глубокого вакуума.

Пример 36: Синтез Ad-PEG₃₄₀₀-Ad, **45**.

Схема XXXXVI.



45

240 мг 1-аминоадамантана (1,60 ммол, Aldrich) и 272 мг PEG₃₄₀₀(SPA)₂ (0,080 ммол, Shearwater Polymer) добавляли в стеклянный сосуд, снабжённый мешалкой. К этой смеси добавляли 5 мл дихлорметана и перемешивали раствор в течение ночи. На следующий день раствор фильтровали для удаления побочного продукта п-гидроксисукцинимиды и удаляли в вакууме дихлорметан. Остаток растворяли в воде и центрифугировали для удаления избытка аминоадамантана. Надосадочную жидкость подвергали диализу в течение ночи в Pierce's Slide-A-Lyser с MWCO=3500. Затем раствор подвергали лиофилизации с получением 248 мг белого пушистого вещества Ad-PEG₃₄₀₀-Ad, **45**.

Пример 37: Синтез ДиЦиклодекстрина PEG, **46**.

362 мг CD-NH₂ (0,32 ммол, Cyclodextrin Technology, Inc.) и 436 мг PEG₃₄₀₀(SPA)₂ (0,128 ммол, Shearwater Polymers) добавляли в стеклянный сосуд, снабжённый мешалкой. В этот сосуд добавляли 4,36 мл DMSO и перемешивали содержимое в течение 72 ч. Раствор подвергали диализу в течение 4 дней в воде, используя мембрану 2000 MWCO. После лиофилизации получали соединение **46** (603 мг, 86%) в виде белого порошка.

Пример 38: Синтез полимера включения **47** с использованием DiAD-Peg **45** и DiCD-Peg **46**.

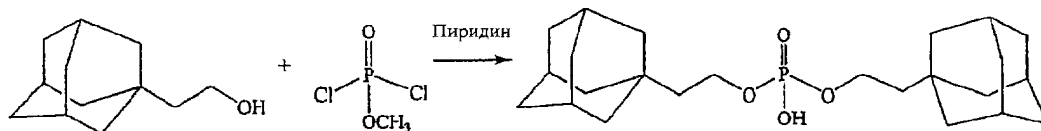
Соединения **46** (54,6 мг, 0,01 ммоль) и **45** (34 мг, 0,01 ммоль) смешивали в среде воды (0,27 мл) и перемешивали в течение ночи. Раствор был очень вязким. Полимер выделяли эфиром и высушивали в вакууме.

Пример 39: Синтез конъюгата полимера включения-CPT, **48**, из DiCD-PEG **46** и CPT-Di-AD.

Синтез алмазного сшивателя: Бис-(2-(1-адамантил)этил)фосфата.

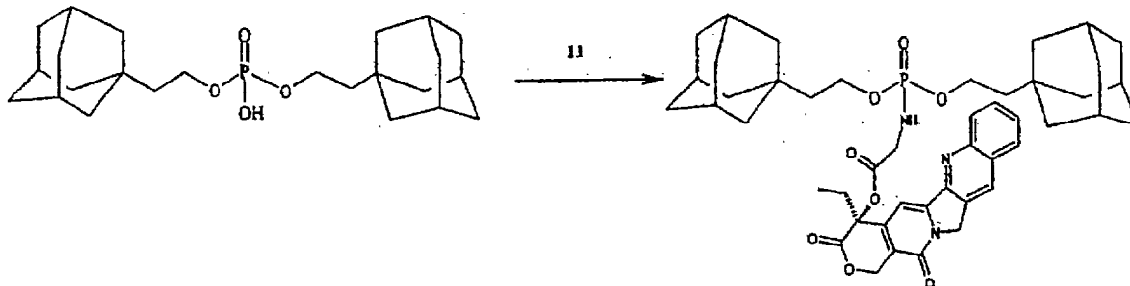
(Zhang et al., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 1676-1681).

Схема XXXXVII



Безводный пиридин (10 мл, Aldrich, Milwaukee, WI) охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли метилдихлорфосфат (1,488 г, 10 ммоль, Aldrich, Milwaukee, WI). Смесь выдерживали на бане ещё 15 минут. В течение этого периода образовался осадок N-метилпиридинийдихлорфосфата. Добавляли 1-адамantanэтанол (4,758 г, 26,4 ммоль, Aldrich, Milwaukee, WI) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем её выливали в 10%-ный раствор NaHCO_3 (50 мл) и выпаривали под вакуумом пиридин. Светло-жёлтый продукт растворяли в 1 л воды и экстрагировали эфиром (три порции по 150 мл). Водную фазу подкисляли 2N HCl до pH 1, затем осуществляли экстракцию тремя порциями смеси CHCl_3 :n-BuOH (7:3). Соединённые органические слои (эфир и смесь CHCl_3 :n-BuOH) промывали водой, в смеси растворителей образовывался светло-жёлтый осадок, растворители выпаривали под вакуумом. Образовавшийся светло-жёлтый продукт перекристаллизовывали из смеси ацетон/гексан. Твёрдый продукт высушивали под вакуумом, выход 60%.

Схема XXXXVIII



Бис-(2-(1-адамантил)этил)фосфат и соединение **11** смешивали в DMSO. К раствору добавляли EDC (1 экв.), NHS (2,2 экв.) и DIEA (1 экв.). Раствор перемешивали в

атмосфере аргона в течение 16 ч. Бис-(2-(1-адамантил)-этил)фосфат-Gly-CPT осаждали эфиром, тщательно промывали растворителем и высушивали под вакуумом. Это соединение и DiCD-PEG, 46, смешивали в DMSO с образованием конъюгата полимера включения-CPT, 48.

Пример 40: Синтез AD-Peg-Фолата, 49.

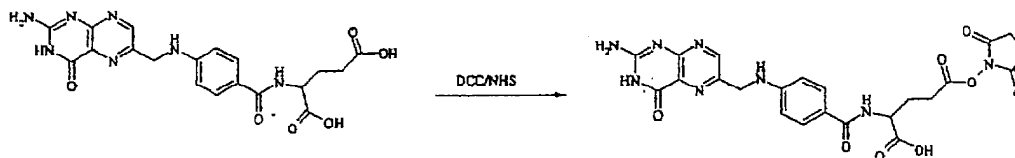
Для синтеза AD-Peg₅₀₀₀-Фолата используют следующую методику. Этот способ может быть адаптирован для синтеза любых трёхкомпонентных соединений гость-линкер-лиганд.

1. Синтез AD-Peg-NH₂.

266 мг FMOC-PEG₅₀₀₀-NHS (78,2 мкмол, Shearwater Polymers, Huntsville, AL) помещали в стеклянный сосуд, снабжённый магнитной мешалкой. Затем добавляли 10 экв. 1-адамантанметиламина (1,5 ммол, Aldrich), растворённого в 3 мл дихлорметана и перемешивали раствор в течение ночи при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме и добавляли воду в оставшийся раствор для растворения PEG продукта. Раствор центрифугировали при 20К об/мин в течение 20 минут, при этом фаза адамантанметиламин отделялась в виде более плотной жидкости. Собирали водную фазу и воду удаляли в вакууме. Оставшуюся вязкую жидкость снова растворяли в 20%-ном растворе пиридина в DMF для снятия защиты FMOC и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, промывали несколько раз DMF, снова растворяли в воде и на анионообменной колонке удаляли не прореагировавший PEG. Первые фракции собирали и лиофилизировали, получая 222 мг белого пушистого порошка (выход 76%), представляющего собой целевой продукт, состав которого подтверждали методом MALDI-TOF.

2. Синтез N-гидроксисукцинимид-фолата (NHS-фолата).

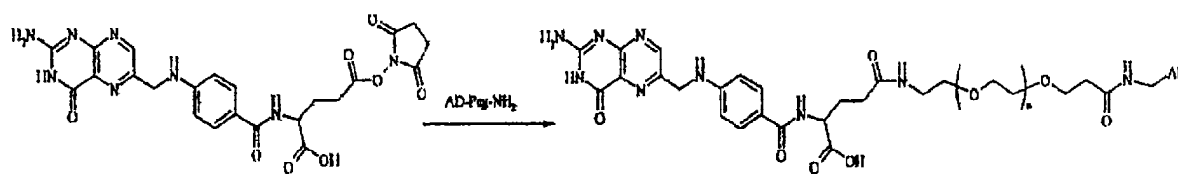
Схема XXXXIX



NHS-фолат получали по методу Lee и Low (Lee, R. J., Low P. S., J. Biol. Chem. 1994, 269, 3198-3204). Фолиевую кислоту (5 г, 11,3 ммол; Sigma) растворяли в DMSO (100 мл) и триэтиламин (2,5 мл) и подвергали взаимодействию с N-гид-роксисукцинимидом (2,6 г, 22,6 ммол) и дипиклогексилкарбодиимидом (4,7 г, 22,7 ммол) в течение ночи при комнатной температуре. Раствор отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении. NHS-фолат осаждали диэтиловым эфиром (оранжево-жёлтый осадок) и промывали 2-3 раза безводным эфиром, сушили под вакуумом и хранили при -20°C.

3. AD-Peg₅₀₀₀-фолат.

Схема L



49

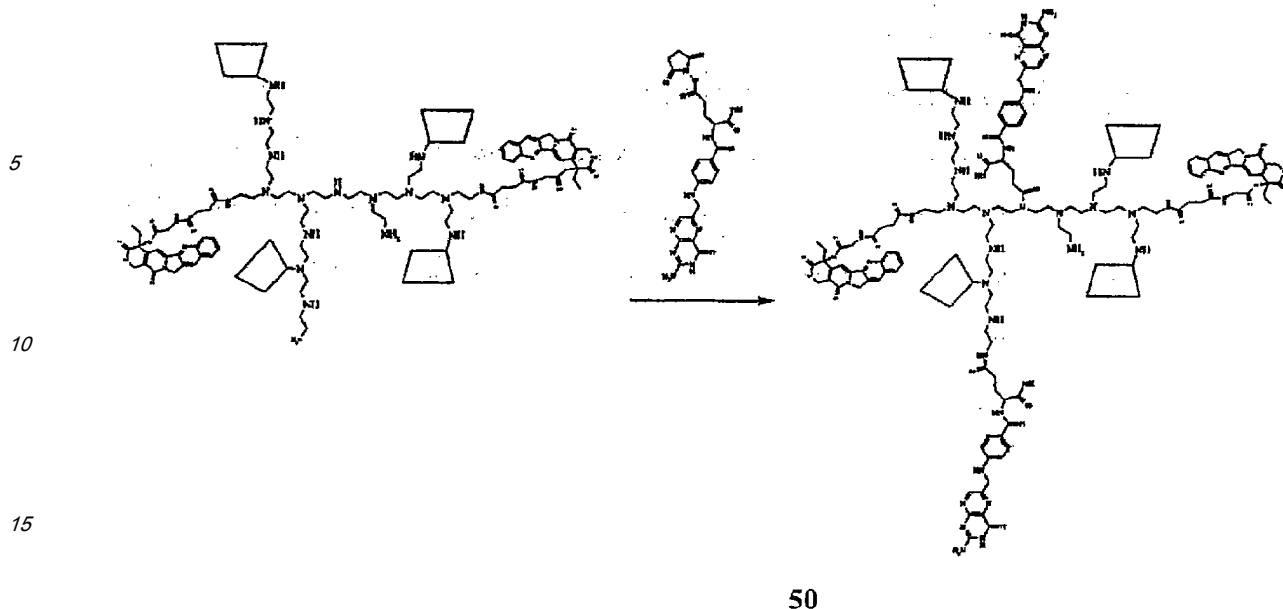
AD-Peg₅₀₀₀-NH₂ и NHS-фолат смешивали в эквивалентном отношении 1:1 в среде DMSO. Добавляли DIEA (2 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем раствор в DMSO подвергали диализу в течение 48 ч с применением мембраны 3500 MWCO (Spectra/Por 7). Получали после лиофилизации AD-Peg₅₀₀₀-фолат.

Пример 41: Состав на основе AD-Peg-Фолата и конъюгата CD-Полимер-CPT.

Типичный метод: конъюгат CD-полимер-CPT растворяли в буфере D5W. Раствор D5W, содержащий 0,1-1 экв. (мол повторяющейся единицы) раствора AD-Peg-Фолата, добавляли к раствору полимера. Размер частиц полимера измеряли до и после добавления AD-Peg-Фолата, используя метод светорассеяния. Раствор использовали в *in vitro* и *in vivo* тестах для определения действия фолата.

Пример 42: Ковалентное связывание целевого лиганда (например, фолата) с конъюгатом полимера CD-CPT (например, PEI-CD-GlyCPT), 50.

Схема LI



PEI-CD-GlyCPT, **44**, и фолат-NHS (0,1-0,5 экв.) смешивали в DMSO и перемешивали в течение 24 ч. Полимер выделяли эфиром и тщательно промывали растворителем до исчезновения фолата. Полученный конъюгат CD-CPT-фолата, **50**, сушили под вакуумом.

Пример 43: Сшивка CD-CPT-полимера, **51**, с применением Ad-Peg-Ad.

Типичный метод: AD-Peg-AD, **45**, (0,01-0,1 экв. повторяющейся единицы в CD-полимере) и конъюгат CD-полимера-CPT смешивали в минимальном количестве DMSO. Полученный вязкий раствор осаждали эфиром и сушили под вакуумом с получением слегка сшитого полимера **51**. Этот полимер **51** должен ещё иметь маленький размер частиц в растворе, иметь хорошую растворимость в воде и больший молекулярный вес, чем родительский конъюгат CD-полимера-CPT.

Пример 44: In vivo испытание конъюгатов полимера с камптотецином **HGGG6**, **LGGG10**, **HG6** и **HGGG10** (синтезирован по примеру 28).

A. In vivo токсичность и химический анализ крови после введения родительского полимера 36e.

Токсичность соединения **36e** и его влияние на химию крови оценивали на самках голых мышей Charles River (возраст 13-14 недель). Четырём группам мышей по 6 мышей в каждой группе вводили D5W раствор соединения **36e** с дозой 240 мг/кг, 160 мг/кг, 80 мг/кг или один D5W путём внутривенной инъекции в хвост на 1-й, 5-й и 9-й день, соответственно. Объём дозирования определяли, исходя из расчёта 200 мкл для мыши весом 20 г, и экстраполировали согласно действительному весу мыши. Вес мышей контролировали ежедневно в течение первых пяти дней и затем 2 раза в неделю. У

каждой мыши на 12-й день отбирали образцы крови (150-200 мкл) из ретроорбитального синуса под действием изофлурана. Образцы крови от трёх мышей в каждой группе использовали для полного анализа крови (CBC), а образцы крови от трёх оставшихся в каждой группе мышей подвергали химическому анализу. Тест заканчивали на 23-й день. Всех мышей умерщвляли путём сердечного укола в атмосфере CO₂ и забирали кровь от каждой мыши для CBC и химического анализа, как на 12-й день.

Не наблюдалось значительной разницы в потере веса или данных CBC или химического анализа у групп, получивших соединение **36e** и контрольных групп, получивших D5W, через 23 дня для всех групп не было отмечено, что действие соединения зависит от времени. Соединение **36e** хорошо переносилось мышами при максимальной дозе (240 мг/кг).

В. Определение максимально переносимой дозы (MTD) для конъюгатов CDP-CPT.

MTD определяли для **HG6**, **LGGG10**, **HGGG10** на самках голых мышей Charles River (возраст 15-16 недель). Перед каждой инъекцией готовили 5%-ный (вес/об) раствор конъюгатов полимер-CPT в декстрозе (D5W). Дозы для групп мышей колебались в пределах от 2,25 мг CPT/кг до 54 мг CPT/кг. Соединения вводились внутривенно в вену в хвостовой части в 1-й, 5-й и 9-й день. Объём дозы определяли на основе отношения 200 мкл для мыши весом 20 г экстраполяцией согласно действительному весу (BW) мыши. Каждая группа состояла из трёх-пяти мышей. Вес мышей определяли ежедневно в течение первых пяти дней и затем дважды в неделю. MTD определяли как самую высокую дозу, которая приводила к снижению среднего значения BW меньше, чем на 20%, или как самую высокую дозу, которая не приводила к смерти ни одну мышь в этой группе. Максимальные значения потери веса и случаев вызванной лечением гибели во всех группах приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Результаты лечения при определении MTD. Голым мышам (n=3-6) вводили соединение внутривенно в хвостовую часть.

Агент	мг/кг ^a	Макс. потеря веса %; день ^b	N _{TR} /N ^c
D5W	-	-2,5%; день 3	0/6
36e	240	-2,0%; день 3	0/6
36e	160	-3,5%; день 13	0/6
36e	80	-2,3%; день 3	0/6

5	LGGG10	54	-20,6%; день 3	3/3
	LGGG10	36	-9,3%; день 13	0/3
	LGGG10	18	0	0/3
	LGGG10	9	0	0/5
	LGGG10	4.5	-0,8%; день 13	0/5
10	HG6	54	-28,5%; день 3	3/3
	HG6	36	-23,9%; день 3	3/3
	HG6	18	-22,1%; день 3	3/3
	HG6	9	-6,1%; день 9	0/5
	HG6	4.5	-4,4%; день 5	0/5
15	HG6	2.25	-2,9%; день 9	0/5
	HGGG10	54	-	3/3
	HGGG10	36	-34%; день 5	3/3
	HGGG10	18	-16%; день 3	1/3
	HGGG10	9	-3,3%; день 9	0/5
20	HGGG10	4.5	-2,5%; день 9	0/5
25				

^a мг CDP/кг для полимера CDP и мг CPT/кг для трёх испытанных конъюгатов;

^b максимальная потеря веса (BW), наблюдаемая после инъекции;

^c число погибших от лечения мышей (N_{TR}) к числу мышей, получивших лечение (N).

MTD LGGG10, HG6 и HGGG10 составляли 36 мг CPT/кг, 9 мг CPT/кг и 9 мг CPT/кг, соответственно. На основе структурной близости HGGG6 и HGGG10 ожидалось, что MTD этих двух групп будут одинаковыми. Следовательно, MTD HGGG6 (не определялась), предположительно, равна 9 мг CPT/кг.

С. Изучение противоопухолевой эффективности.

Определение противоопухолевой эффективности проводили на голых мышах Charles River (самки, возраст 15-16 недель). Фрагмент (1 мм^3) ткани карциномы толстой кишки человека LS174T имплантировали подкожно в правый бок каждой мыши примерно за 14-18 дней перед началом лечения. Объём опухоли определяли путём измерения кронциркулем опухоли в двух измерениях и вычисления по формуле: объём опухоли = $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$. Объём опухоли переводили в вес опухоли, предполагая, что 1 мм^3 равен 1 мг опухоли. Лечение начинали, когда средний размер опухоли достигал 60-100 мг (1-й день). Животных подразделяли на 12 групп. Каждая группа состояла из

семи мышей с размерами опухолей в интервале от 62,5-144,0 мг, средний размер опухолей в группе равнялся 88,6-90,7 мг. Мышей в каждой группе подвергали лечению согласно протоколу, приведённому в Таблице 6. Все конъюгаты вводили внутривенно в хвостовую часть. Размер опухолей измеряли дважды в неделю. В конце опыта опухоли каждой погибшей мыши собирали и замораживали при -80°C.

Таблица 6. Протокол лечения при изучении эффективности.^a

Группа	Агент	Доза (мг СРТ/кг) ^b	Путь введения ^c	Схема ^d
1	D5W	-	в.в.	Q4D x 3
2	CPT	9	в.п.	Q4D x 2 ^e
3	иринотекан	100 ^f	в.п.	Qwk x 3
4	HGGG6	9	в.в.	Q4D x 3
5	HGGG6	4.5	в.в.	Q4D x 3
6	LGGG10	36	в.в.	Q4D x 3
7	LGGG10	18	в.в.	Q4D x 3
8	LGGG10	9	в.в.	Q4D x 3
9	HG6	9	в.в.	Q4D x 3
10	HG6	4.5	в.в.	Q4D x 3
11	HGGG10	9	в.в.	Q4D x 3
12	HGGG10	4.5	в.в.	Q4D x 3

^a в каждой группе семь мышей;

^b дозы эквиваленты СРТ, кроме группы 3;

^c в.в. = внутривенно; в.п. = внутриперитонеально;

^d схема введения – сокращения типа Q4D x 3 = три инъекции с четырёхдневными интервалами, Qwk x 3 = три инъекции с недельным интервалом, первая доза введена в 1-й день всем группам;

^e третью дозу не вводили из-за токсичности;

^f 100 мг иринотекана/кг.

Каждое животное умерщвляли, когда вес опухоли достиг заданного конечного размера (1500 мг). Время конечной точки (TTE) для каждой мыши рассчитывали по уравнению: $TTE = (\log(\text{конечная точка} - b))/m$, где b и m обозначают, соответственно,

отрезок и наклон линии, полученной путём линейной регрессии логарифмически преобразованных данных о росте опухоли, которые состоят из первой величины, превысившей конечный объём, и трёх последовательных величин, которые предшествовали достижению конечного объёма. Животным, у которых опухоль не достигла конечного объёма, присваивали величину TTE, равную размеру опухоли в последний день исследования (114 день). Животные, причиной гибели которых не являлось лечение (NTR), не учитывались при определении TTE. Задержка роста опухоли (TGD), определяемая как увеличение среднего времени до достижения конечной точки (TTE) в группе, получившей лечение, по сравнению с контрольной группой представляла собой один параметр, который определяли при оценке эффективности лечения. TGD определяли как разницу между средним значением TTE для группы, получившей лечение, и средним значением TTE для контрольной группы ($TGD = T - C$) и выражали в днях или как величину в %% среднего значения TTE для контрольной группы; $\% TGD = (T - C)/C$, где T – среднее значение TTE для групп, получивших лечение, и C – среднее значение TTE для контрольной группы I.

Токсичность. Животных взвешивали ежедневно с первого по пятый день, а затем дважды в неделю. Часто мышей осматривали для выявления признаков любых связанных с лекарством побочных эффектов. Приемлемая величина токсичности для противораковых лекарств для мышей NCI определялась как средняя величина потери веса в группе менее, чем на 20% во время опыта, при этом среди семи животных, получивших лечение, должно было быть не более одной смерти, вызванной токсичностью лекарства. Результаты этого изучения эффективности, включающие средние значения величин TTE, средние величины веса опухолей на 114-й день, результаты лечения и количество погибших мышей приведены в Таблице 7.

Таблица 7.

Группа	Среднее значение TTE ^a	T – C ^b	%TGD ^c	Средний вес опухоли в мг (N _S ^d)	N _{TR} ^e / N _{TR} ^f / N _{EU} ^g	Pvs D5W ^h	Pvs CPT ⁱ
1	34,9	-	-	-(0)	0/1/6	-	-
2	51,4	16,5	47%	-(0)	2/0/5	0,2128	-
3	68,7	33,8	97%	1152 (3)	0/0/4	0,0002	0,0253
4	114,0	79,1	227%	256 (5)	1/0/1	0,0040	0,0115
5	65,6	30,7	88%	566 (2)	0/1/4	0,0046	0,1369

5	6	100,0	65,1	187%	666 (3)	4/0/0	0,0272	0,0289
	7	75,6	40,7	117%	221 (3)	0/0/4	0,0018	0,0601
	8	63,2	28,3	81%	700 (1)	1/0/5	0,0006	0,1064
	9	114,0	79,1	227%	394 (4)	0/0/3	0,0002	0,0028
	10	74,2	39,3	113%	668 (2)	1/1/3	0,0016	0,0673
10	11	114,0	79,1	227%	500 (5)	1/0/1	0,0040	0,0050
	12	78,0	43,1	123%	1010 (2)	0/0/6	0,0006	0,0392

^a TTE = время (дни) до конечной точки (1500 мг);

^b T–C – разница между TTE (дни) для мышей, получивших лечение, и контрольной группой;

^c %TGD = [(T – C)/C]

^d выжившие мыши

^e N_{TR} = количество погибших вследствие лечения мышей;

^f N_{TR} = количество мышей, погибших не от лечения

^g N_{EU} = количество мышей, умерщвлённых после достижения конечной точки;

^h величина P для группы, которой вводили D5W (группа 1);

ⁱ величина P для группы, которой вводили CPT (группа 2).

Одна мышь из контрольной группы, которой вводили D5W, погибла на 72-й день.

Опухоли у других шести мышей из контрольной группы выросли до конечного размера 1500 мг, что соответствовало среднему значению TTE, равному 34,9 дн (Таблица 7).

Две мыши из числа получивших лекарство погибли на 9-й день при дозе CPT, равной 9 мг/кг. Таким образом, в этом опыте CPT при этой дозе может считаться токсичным.

Среднее значение TTE для этой группы составило 51,4 дн, что соответствует T–C, равной 16,5 дн и TGD, равному 47% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей (не значительное). Во второй группе ни одно животное не выжило на 114 день.

Третья группа получала иринотекан внутривентрально с дозой 100 мг/кг (Qwk x 3). Среднее значение TTE для третьей группы составляло 68,7 дн, что соответствует T–C, равному 33,8 дн, и TGD, равному 97% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей (P < 0,01). На 114-й день в живых оставались три мыши, у которых средний вес опухоли равнялся 1,152 мг. В дальнейшем регрессия не наблюдалась.

Мышам 4-й и 5-й групп вводили внутривенно **HGGG6** по схеме Q4Dx3 при содержании CPT 9 и 4,5 мг/кг, соответственно. В 4-й группе на 16-й день погибла одна мышь, а в 5-й группе на 37-й день тоже погибла одна мышь. Среднее значение TTE для 4-й группы

составляло 114 дн, это было максимальное значение в этом опыте. Эта величина TTE соответствует величине T–C, равной 79,1 дн, и TGD, равной 227% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей ($P < 0,01$). Опухоли у пяти мышей из 4-й группы не достигали конечной величины 1500 мг. У этих пяти мышей средний вес опухоли на 114-й день составил 256 мг. Средняя величина TTE для 5-й группы составила 65,6 дн, что соответствует величине T–C, равной 30,7 дн, и TGD, равной 88% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей ($P < 0,01$).

Мышам в группах 6-8 вводили внутривенно по схеме Q4Dx3 **LG6G10** с дозами СРТ, равными 36, 18 и 9 мг/кг. Хотя при определении MTD с использованием этого конъюгата не погибла ни одна мышь, не имевшая опухоль, при дозе 36 мг СРТ/кг (Таблица 5), в 6-й группе погибли 4 мыши, которым вводили эту дозу – две на 16-й день, одна на 75-й день и одна на 100-й день. Эти результаты показывают, что доза, равная 36 мг СРТ/кг, вероятно, превышает MTD для **LG6G10**. Как видно из Таблицы 5, при определении MTD не отмечалась значительная потеря веса, когда мышам вводили дозу, равную 18 мг СРТ/кг, что показывает, что эта доза ниже MTD. Следовательно, MTD для **LG6G10** находится между 18 и 36 мг СРТ/кг. Средняя величина TTE для 7-й группы (18 мг СРТ/кг) составила 75,6 дн. Эта величина TTE соответствует величине T–C, равной 40,7 дн, величине TGD, равной 117% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей ($P < 0,01$). У трёх мышей в этой группе средний вес опухолей на 114-й день составлял 221 мг. В 8-й группе на 103-й день погибла одна мышь (9 мг СРТ/кг). Средняя величина TTE для 8-й группы составила 63,2 дн. Эта величина TTE соответствует величине T–C, равной 28,3 дн и величине TGD, равной 81% по отношению к величине, характерной для контрольных мышей ($P < 0,01$). У остальных мышей в этой группе вес опухоли на 114-й день составил 700 мг.

Мышам 9-й и 10-й групп вводили внутривенно **HG6** по схеме Q4D x 3 с дозой 9 и 4,5 мг СРТ/кг, соответственно. В 10-й группе наблюдали гибель одной мыши, получившей лекарство, и гибель мыши, не обусловленная лечением, на 47-й и 84-й дни, соответственно. Средняя величина TTE для 9-й группы была максимальной, равной 114 дн. Эта величина TTE соответствует значению T–C, равному 79,1 дн, и величине TGD, равной 227% по отношению к величине для контрольных мышей ($P < 0,01$). У четырёх мышей в 9-й группе размер опухоли составил 394 мг на 114-й день. Средняя величина TTE для 10-й группы равнялась 74,2 дн. Эта величина TTE соответствует значению T–C, равному 39,3 дн, и величине TGD, равной 113% по отношению к величине для

контрольных мышей ($P < 0,01$). У остальных двух мышей в 10-й группе средний вес опухоли на 114-й день составил 668 мг.

Мышам 11-й и 12-й групп вводили внутривенно **HGGG10** по схеме Q4D x 3 с дозой 9 и 4,5 мг СРТ/кг, соответственно. В 11-й группе на 16-й день погибла вследствие лечения одна мышь. Средняя величина TTE для 11-й и 12-й групп равнялась 114 дн и 78 дн, соответственно. Величина TTE для 11-й группы соответствует значению T-C, равному 79,1 дн, и величине TGD, равной 227% по отношению к величине для контрольных мышей ($P < 0,01$). Опухоли у пяти мышей в 11-й группе не достигали конечной величины, у них средний вес опухоли равнялся 500 мг на 114-й день. Величина TTE для 12-й группы соответствует значению T-C, равному 43,1 дн, и величине TGD, равной 123% по отношению к величине для контрольных мышей ($P < 0,01$). У оставшихся двух мышей этой группы средний вес опухоли на 114-й день составил 1010 мг.

Зависимость размера опухоли от времени для D5W, СРТ, иринотекана, **LGGG10** в максимальной нетоксичной дозе (18 мг СРТ/кг) и трёх других конъюгатов с высокомолекулярным полимером (**HGGG6**, **HG6** и **HGGG10**) при их MTD показана на Фиг. 8. Эти три высокомолекулярных конъюгата, введённых в их MTD, проявляли более продолжительное ингибирование роста опухолей по сравнению с D5W, СРТ и иринотеканом. Кривые зависимости размера опухолей для **HGGG6**, **HG6** и **HGGG10**, показанные на Фиг. 9, показывают, что для всех трёх полимеров при введении в их MTD и в дозе, составляющей половину MTD, наблюдался чёткий ответ на величину дозы.

Зависимости среднего размера опухоли для **LGGG10** и **HGGG10**, введённых с дозой 9 мг СРТ/кг, как показано на Фиг. 10, показывают, что конъюгат высокомолекулярный полимер-лекарство проявляет более сильный противоопухолевый эффект по сравнению с низкомолекулярными конъюгатами, вероятно, вследствие повышенной аккумуляции (EPR эффект) и сниженного почечного клиренса.

Средняя величина потери веса у мышей. Зависимость средних величин потери веса (MBW) от времени для D5W, СРТ, иринотекана и трёх конъюгатов, содержащих высокомолекулярный полимер в их MTD, показаны на Фиг. 11. Максимальные значения MBW наблюдались во 2-й группе (СРТ) и для двух конъюгатов с триглицидным линкером при их введении в MTD (группы 4 и 11), что составляло 13,1%, 18,3%, 12,6%, соответственно. Максимальные значения MBW для **HG6** (3,4%), единственного конъюгата с глициновым линкером, аналогично максимальному значению MBW для иринотекана (5%). Незначительные ($< 5\%$) максимальные средние значения величин

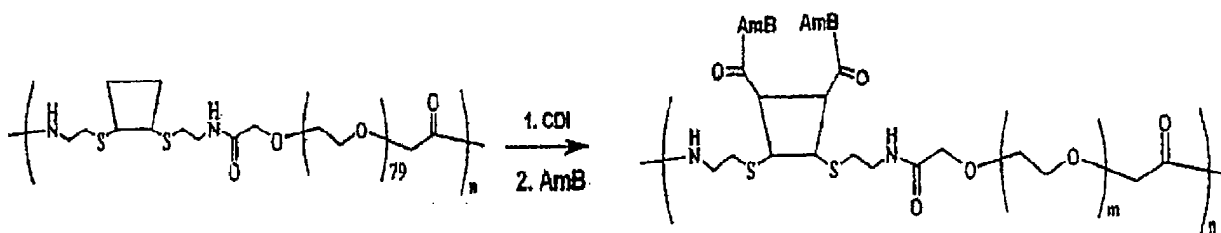
потери веса были зафиксированы во всех остальных группах с применением лекарств и в группе с применением D5W. Средние значения веса вернулись к своему значению во всех группах после прекращения лечения.

D. Корреляция размера опухоли умерщвлённой мыши и концентрации CPT в соответствующей опухоли.

Каждую опухоль, выращенную у мышей, после завершения опыта с ксенографтом LS174t, извлекали и помещали в лизисную пробирку объёмом 2 мл (Lysing Matrix D, Qiagen). В каждую пробирку добавляли 300 мкл лизисного реагента (Cellytic-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction). Ткань подвергали гомогенизации на гомогенизаторе FastPrep FP12 (Qiagen) в течение 40 с при 5 м/с. Гомогенизацию повторяли шесть раз с 10-минутным интервалом между гомогенизациями. Гомогенизованный раствор центрифугировали при 14000 г в течение 15 мин при 10°C. 90 мкл раствора отбирали шприцем и добавляли 10 мкл 1N NaOH. К этому раствору добавляли аликвоту 400 мкл MeOH после выдержки гомогенизованного раствора в течение 2 ч при комнатной температуре. Раствор центрифугировали в течение 15 мин при 14000 г. Надосадочную жидкость (270 мкл) смешивали с 30 мкл 1N HCl и подвергали анализу методом ЖХВР. Корреляция концентрации CPT (нг/мг ткани) и размера опухоли показана на Фиг. 12. Концентрация CPT обратно пропорциональна размеру опухоли.

Пример 45: Синтез Поли(CDDC-PEG)-Амфотерицин В, **52**, при использовании амидного линкера.

Схема LII

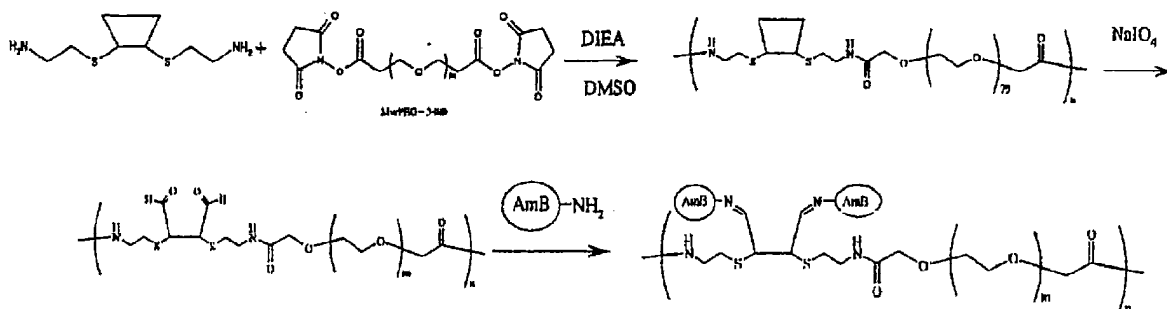


52

Поли(CDDC-PEG) (788 мг) и 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI, 1,45г, 50 экв.) перемешивали в безводном DMSO (10 мл) в присутствии DMAP(429 мг, 20 экв.) в течение 16 ч. Для осаждения поли(CDDC-PEG)карбонилдиимидазола к смеси добавляли эфир (200 мл). Полученный продукт жёлтого цвета промывали эфиром 2х200 мл и сушили под вакуумом. Твёрдый продукт растворяли в безводном DMSO (15 мл) и затем добавляли AmB (332 мг, 2 экв.) и DMAP(43,0 мг, 2 экв.). Раствор перемешивали в

темноте в течение 48 ч и подвергали диализу в воде, используя 25000 MWCO мембрану, в течение 3 дней. Затем раствор фильтровали на фильтре 0,2 мкм и лиофилизировали. Получали продукт жёлтого цвета (920 мг), **52**. Содержание АмВ составило примерно 13 вес.%.
 5

Пример 46: Синтез Поли(CDDC-PEG)-Амфотерицин В, **53**, с применением имидного линкера.
 10



53

Соединение **3** и PEG-DiSPA (соотношение 1:1) высушивали под вакуумом при комнатной температуре. Добавляли DMSO (10 мг 3/мл DMSO) и затем DIEA (2 экв.). Полимер выделяли избытком эфира через 5 дней и подвергали диализу в течение 48 ч на мембране 25 000 MWCO. Выход поли(CDDC-PEG) равнялся 80-95%. M_w полимера определяли методом гелепроникающей хроматографии, он равен 70-100 кДа.
 20

Поли(CDDC-PEG) (1,124 г, 0,25 ммол) растворяли в воде (55 мл). Добавляли NaIO_4 (0,264 г, 5 экв.). Раствор перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут и хранили при 4°C в течение 24 ч в темноте. К раствору добавляли раствор BaCl_2 (5,05 экв.), что вызвало немедленное осаждение $\text{Ba}(\text{IO}_4)_2$. Осадок отфильтровывали. Для получения pH, равного 11, добавляли насыщенный раствор Na_2CO_3 . Затем к раствору добавляли амфотерицин В (343 мг, 1,5 экв.) и перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение 48 ч. pH раствора, равный 11, поддерживали добавлением NaOH (0,1 N). Раствор подвергали диализу при 4°C в течение 48 ч, используя мембрану 25 000 MWCO, и осуществляли лиофилизацию с получением 1,03 г конъюгата полимера-АмВ, **53**, в виде жёлтого порошка. Содержание АмВ равнялось 18 вес.% по данным УФ-спектроскопии при длине волны 405 нм.
 30
 35
 40

45 D. Ссылки.

Другие циклодекстринсодержащие полимеры, которые могут быть модифицированы согласно данному изобретению, а также способы получения таких полимеров описаны в заявках США 09/203556, 09/339818, 09/453707, 10/021294 и
 50

полимеров описаны в заявках США 09/203556, 09/339818, 09/453707, 10/021294 и 10/021312.

5

Эквиваленты.

Специалистам в данной области ясно, чтобы, используя только рутинные эксперименты, можно осуществить многочисленные эквиваленты соединений и способов их использования, описанные в данной заявке. Такие эквиваленты входят в объём данного изобретения.

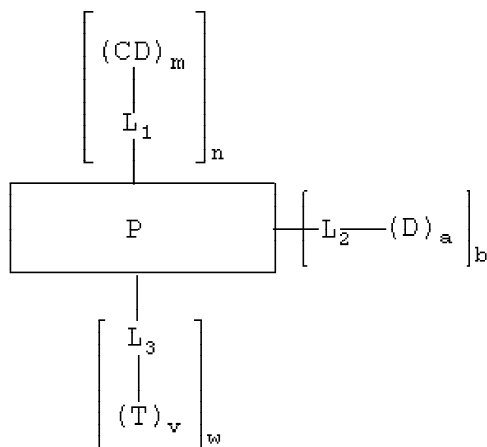
10

Формула изобретения

15

1. Содержащее циклодекстрин полимерное соединение для доставки терапевтических агентов, имеющее структуру, представленную формулой I

20



25

30

(I)

(I)

где P обозначает линейную или разветвленную полимерную цепь;

CD обозначает звенья циклодекстрина;

L₁ и L₃ независимо в каждом случае могут отсутствовать или обозначать группу линкера

и L₁ представляет группу линкера с биогидролизуемой или биоразлагаемой связью с D;

D независимо в каждом случае обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

T независимо в каждом случае обозначает целевой лиганд или его предшественник;

a, m и v независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 1 до 10;

n и w независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 0 до

примерно 30000; и

b представляет целое число в интервале от 1 до примерно 30000,

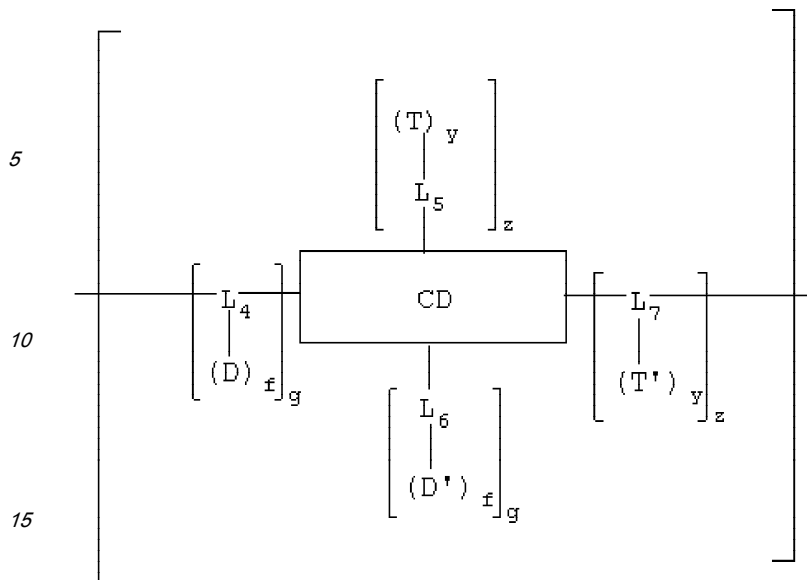
причем или P содержит звенья циклодекстрина, или n равно, по меньшей мере, 1.

2. Соединение по п.1, у которого полимерная цепь содержит n' единиц U, причем n'

обозначает целое число в интервале от 1 до примерно 30000 и U представлено следующей

формулой

50



где CD обозначает циклодекстриновую молекулу или ее производное; L_4 , L_5 , и L_7 независимо в каждом случае могут отсутствовать или обозначать группу линкера и L_6 представляет группу линкера с биогидролизуемой или биоразлагаемой связью с D;

D и D' независимо в каждом случае обозначают один и тот же или разные терапевтические агенты или их пролекарства;

T и T' независимо в каждом случае обозначают один и тот же или разные целевые лиганды или их предшественники;

f и y независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 1 до 10; и

g и z независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 0 до 10.

3. Соединение по пп.1 и 2, у которого линкерная группа представляет собой гидрокарбиленовую группу, в которой одна или более метиленовых групп, возможно, замещены группой Y (при условии, что ни одна из групп Y не является смежной с другой группой Y), где каждая группа Y независимо в каждом случае выбрана из замещенного или незамещенного арила, гетероарила, циклоалкила, гетероциклоалкила или -O-, C(=X) (где X обозначает NR_1 , O или S), -OC(O)-, -C(=O)O-, -NR₁-, -NR₁CO-, -C(O)NR₁-, -S(O_n)- (где n равен 0, 1 или 2), -OC(O)-NR₁-, -NR₁-C(O)-NR₁-, -NR₁-C(NR₁)-NR₁- и -B(OR₁)-; и R₁ независимо в каждом случае обозначает H или низший алкил.

4. Соединение по пп.1 и 2, у которого линкерная группа представляет собой аминокислоту, или пептид, или его производное.

5. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент является малой молекулой, пептидом, белком или полимером, обладающим терапевтической активностью.

6. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент является гидрофобным ($\log P > 0,4, 0,6, 0,8, 1$).

7. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент имеет низкую растворимость в воде.

8. Соединение по пп.1 и 2, у которого целевой лиганд ковалентно связан с линкерной группой через биогидролизуемую связь.

9. Соединение по пп.1 и 2, у которого биогидролизуемая связь выбрана из сложноэфирной, амидной, карбонатной или карбаматной связи.

10. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент ковалентно связан с линкерной группой, которая содержит сложноэфирную, амидную, карбонатную или карбаматную связь.

11. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент выбран из противоракового, противогрибкового, антибактериального, антимикотического или противовирусного агента.

12. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент является агонистом

рецептора.

13. Соединение по пп.1 и 2, у которого терапевтический агент является антагонистом рецептора.

14. Соединение по пп.1 и 2, которое является биоразлагаемым или биоразрушаемым.

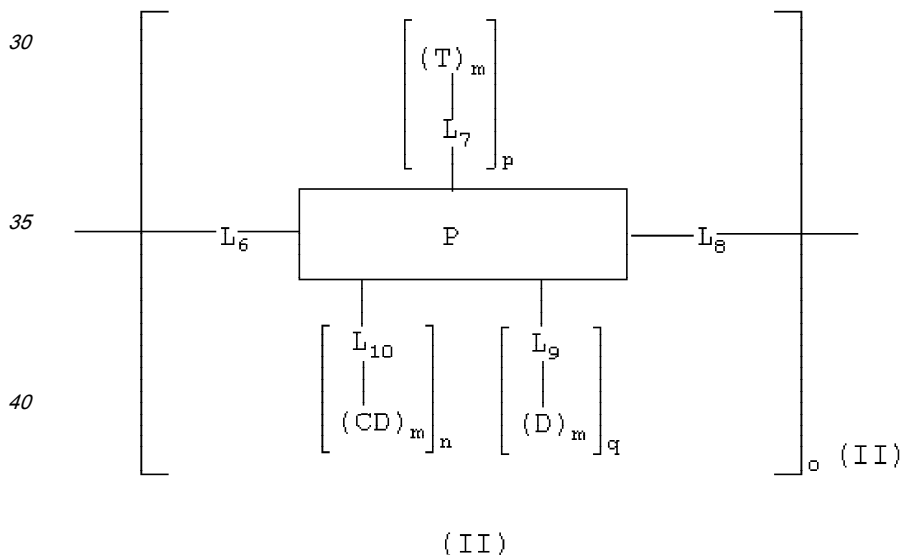
15. Соединение по пп.1 и 2, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 500000 ср.мол.ед.

16. Соединение по пп.1 и 2, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 5000 до 200000 ср.мол.ед.

17. Соединение по пп.1 и 2, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 100000 ср.мол.ед.

18. Соединение по пп.1 и 2, отличающееся тем, что терапевтический агент выбран из анорексиков, противоартритных средств, противоастматических агентов, противосудорожных средств, антидепрессантов, антигистаминных агентов, противовоспалительных агентов, противоотечных средств, антинеопластических агентов, антипсихотических агентов, антипиретиков, противоспазматических средств, сердечно-сосудистых препаратов, антигипертензивных средств, диуретиков, вазодилаторных средств, стимулянтов центральной нервной системы, питательных веществ, противорвотных средств, противозудных средств, препаратов от кашля и простуды, нейролептических агентов, антидепрессантов, антагонистов, диагностических препаратов, гормонов, стимулянтов роста костей и ингибиторов резорбции костей, иммуносуппрессантов, релаксантов мышц, психостимулянтов, седативных средств, транквилизаторов, противовоспалительных агентов, противоэпилептических средств, анестетиков, гипнотических, нейролептических агентов, анксиолитиков, противосудорожных агентов, агентов, блокирующих действие на нейроны, антихолинергических и холиномиметических агентов, антимускариновых и мускариновых агентов, антиадренергетиков, антиаритмических средств и антигипертензивных агентов.

19. Содержащее циклодекстрин полимерное соединение для доставки терапевтических агентов, имеющее структуру, представленную формулой II



где P обозначает мономерное звено полимера;

T независимо в каждом случае обозначает целевой лиганд или его предшественник;

L_6 , L_7 , L_8 , и L_{10} независимо в каждом случае могут отсутствовать или обозначать группу линкера и L_9 представляет группу линкера с биогидролизуемой или биоразлагаемой связью с D;

CD независимо в каждом случае обозначает циклодекстриновый фрагмент или его производного;

D независимо в каждом случае обозначает терапевтический агент или его пролекарство;

m независимо в каждом случае обозначает целое число в интервале от 1 до 10;

р, п и q независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 0 до 10, причем CD и D, каждый, присутствует в соединении по меньшей мере один раз.

20. Соединение по п.19, у которого линкерная группа представляет собой

гидрокарбиленовую группу, в которой одна или более метиленовых групп, возможно,

5 замещены группой Y (при условии, что ни одна из групп Y не является смежной с другой группой Y), где каждая группа Y независимо в каждом случае выбрана из замещенного или незамещенного арила, гетероарила, циклоалкила, гетероциклоалкила или -O-, C(=X) (где X обозначает NR₁, O или S), -OC(O)-, -C(=O)O-, -NR₁-, -NR₁CO-, -C(O)NR₁-, -S(O_n)- (где n равен 0,1 или 2), -OC(O)-NR₁-, -NR₁-C(O)-NR₁-, -NR₁-C(NR₁)-NR₁- и -B(OR₁)-; и R₁

10 независимо в каждом случае обозначает H или низший алкил.

21. Соединение по п.19, у которого линкерная группа представляет собой аминокислоту, или пептид, или его производное.

22. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент является малой молекулой, пептидом, белком или полимером, обладающим терапевтической активностью.

15 23. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент является гидрофобным (log P > 0,4, 0,6, 0,8, 1).

24. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент имеет низкую растворимость в воде.

20 25. Соединение по п.19, у которого целевой лиганд ковалентно связан с линкерной группой через биогидролизуемую связь.

26. Соединение по п.25, у которого биогидролизуемая связь выбрана из сложноэфирной, амидной, карбонатной или карбаматной связи.

25 27. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент ковалентно связан с линкерной группой, которая содержит сложноэфирную, амидную, карбонатную или карбаматную связь.

28. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент выбран из противоракового, противогрибкового, антибактериального, антимикотического или противовирусного агента.

29. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент является агонистом рецептора.

30 30. Соединение по п.19, у которого терапевтический агент является антагонистом рецептора.

31. Соединение по п.19, которое является биоразлагаемым или биоразрушаемым.

32. Соединение по п.19, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 500000 ср.мол.ед.

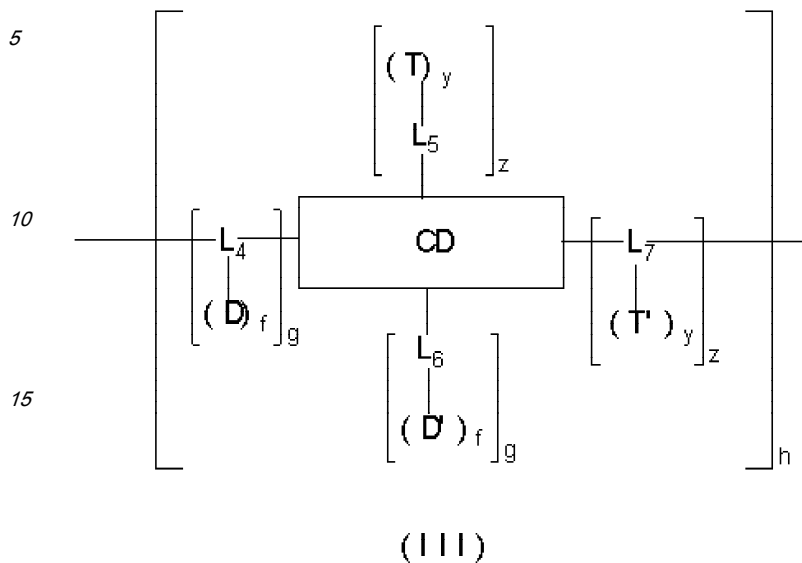
35 33. Соединение по п.19, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 5000 до 200000 ср.мол.ед.

34. Соединение по п.19, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 100000 ср.мол.ед.

35. Соединение по п.19, отличающееся тем, что терапевтический агент выбран из
40 анорексиков, противоартритных средств, противоастматических агентов, противосудорожных средств, антидепрессантов, антигистаминных агентов, противовоспалительных агентов, противоотечных средств, антинеопластических агентов, антипсихотических агентов, антипиретиков, противоспазматических средств, сердечно-сосудистых препаратов, антигипертензивных средств, диуретиков, вазодилаторных
45 средств, стимулянтов центральной нервной системы, питательных веществ, противорвотных средств, противовоздушных средств, препаратов от кашля и простуды, нейролептических агентов, антидепрессантов, антагонистов, диагностических препаратов, гормонов, стимулянтов роста костей и ингибиторов резорбции костей, иммуносуппрессантов, релаксантов мышц, психостимулянтов, седативных средств,
50 транквилизаторов, противовоспалительных агентов, противоэпилептических средств, анестетиков, гипнотических, нейролептических агентов, анксиолитиков, противосудорожных агентов, агентов, блокирующих действие на нейроны, антихолинэргических и холиномиметических агентов, антимускариновых и мускариновых

агентов, антиадренергетиков, антиаритмических средств и антигипертензивных агентов.

36. Содержащее циклодекстрин полимерное соединение для доставки терапевтических агентов, имеющее структуру, представленную формулой III



где CD обозначает циклодекстриновую молекулу или ее производное;

L₄, L₅ и L₇ независимо в каждом случае могут отсутствовать или обозначать группу линкера, и L₆ представляет группу линкера с биогидролизуемой или биоразлагаемой связью с D;

D и D' независимо в каждом случае обозначают один и тот же или разные терапевтические агенты или их пролекарства;

T и T' независимо в каждом случае обозначают один и тот же или различные лиганды или их предшественники;

f и y независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 1 до 10;

g и z независимо в каждом случае обозначают целое число в интервале от 0 до 10, причем по меньшей мере одно значение g и по меньшей мере одно значение z обозначает целое число, превышающее 0.

37. Соединение по п.36, у которого линкерная группа представляет собой гидрокарбиленовую группу, в которой одна или более метиленовых групп, возможно, замещены группой Y (при условии, что ни одна из групп Y не является смежной с другой группой Y), где каждая группа Y независимо в каждом случае выбрана из замещенного или незамещенного арила, гетероарила, циклоалкила, гетероциклоалкила или -O-, C(=X) (где X обозначает NR₁, O или S), -OC(O)-, -C(=O)O, -NR₁-, -NR₁CO-, -C(O)NR₁-, -S(O_n)- (где n равен 0, 1 или 2), -OC(O)-NR₁-, -NR₁-C(O)-NR₁-, -NR₁-C(NR₁)-NR₁- и -B(OR₁)-, и R₁ независимо в каждом случае обозначает H или низший алкил.

38. Соединение по п.36, у которого линкерная группа представляет собой аминокислоту, или пептид, или его производное.

39. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент является малой молекулой, пептидом, белком или полимером, обладающим терапевтической активностью.

40. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент является гидрофобным ($\log P > 0,4, 0,6, 0,8, 1$).

41. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент имеет низкую растворимость в воде.

42. Соединение по п.36, у которого целевой лиганд ковалентно связан с линкерной группой через биогидролизуемую связь.

43. Соединение по п.42, у которого биогидролизуемая связь выбрана из сложноэфирной, амидной, карбонатной или карбаматной связи.

44. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент ковалентно связан с линкерной группой, которая содержит сложноэфирную, амидную, карбонатную или

карбаматную связь.

45. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент выбран из противоракового, противогрибкового, антибактериального, антимикотического или противовирусного агента.

46. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент является агонистом рецептора.

47. Соединение по п.36, у которого терапевтический агент является антагонистом рецептора.

48. Соединение по п.36, которое является биоразлагаемым или биоразрушаемым.

49. Соединение по п.36, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 500000 ср.мол.ед.

50. Соединение по п.36, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 5000 до 200000 ср.мол.ед.

51. Соединение по п.36, которое имеет среднечисленный молекулярный вес (M_n) в пределах от 10000 до 100000 ср.мол.ед.

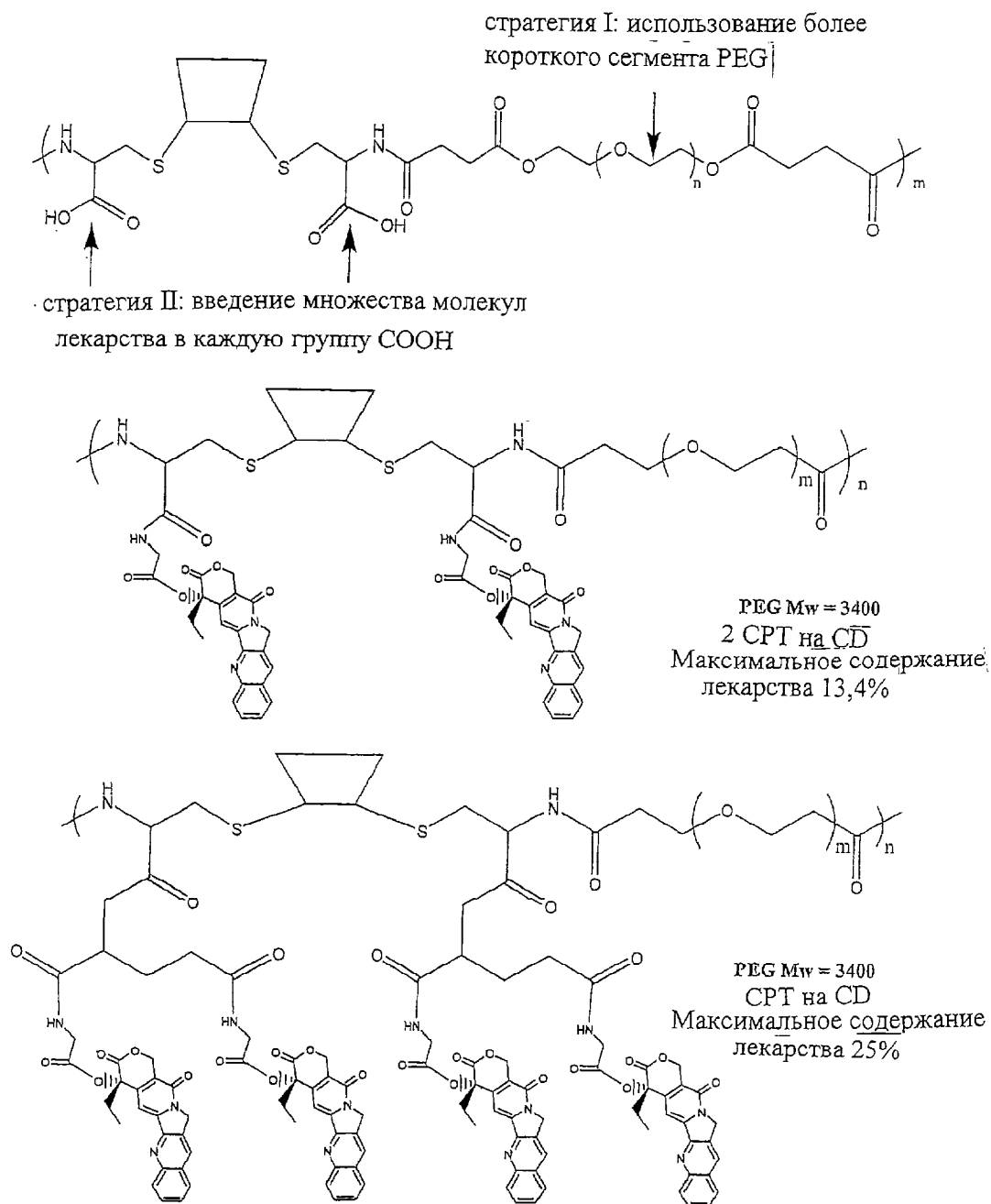
52. Соединение по п.36, отличающееся тем, что терапевтический агент выбран из анорексиков, противоартритных средств, противоастматических агентов, противосудорожных средств, антидепрессантов, антигистаминных агентов, противовоспалительных агентов, противоотечных средств, антинеопластических агентов, антипсихотических агентов, антипиретиков, противоспазматических средств, сердечно-сосудистых препаратов, антигипертензивных средств, диуретиков, вазодилаторных средств, стимулянтов центральной нервной системы, питательных веществ, противорвотных средств, противовоздушных средств, препаратов от кашля и простуды, нейролептических агентов, антидепрессантов, антагонистов, диагностических препаратов, гормонов, стимулянтов роста костей и ингибиторов резорбции костей, иммуносуппрессантов, релаксантов мышц, психостимулянтов, седативных средств, транквилизаторов, противовоспалительных агентов, противоэпилептических средств, анестетиков, гипнотических, нейролептических агентов, анксиолитиков, противосудорожных агентов, агентов, блокирующих действие на нейроны, антихолинергических и холиномиметических агентов, антимускариновых и мускариновых агентов, антиадренергетиков, антиаритмических средств и антигипертензивных агентов.

53. Фармацевтический препарат, обладающий противоопухолевой активностью, содержащий фармацевтический эксципиент и от 0,01 до 2000 мг соединения по любому из пп.1, 2, 19, 36 или его фармацевтически приемлемого сложного эфира, соли или гидрата.

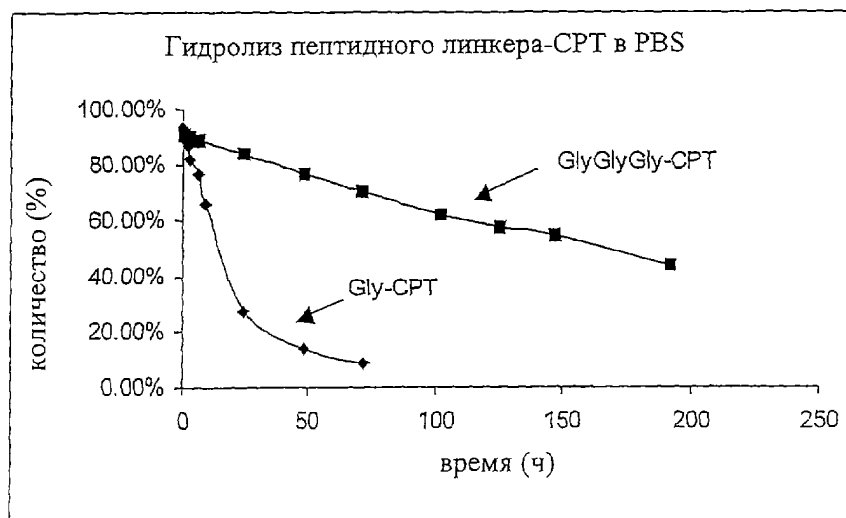
54. Фармацевтическая дозированная форма, обладающая противоопухолевой активностью, содержащая фармацевтический эксципиент и от 0,01 до 2000 мг соединения по любому из пп.1, 2, 19, 36 или его фармацевтически приемлемого сложного эфира, соли или гидрата.

55. Применение соединений по любому из пп.1, 2, 19, 36 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.

56. Линейный водорастворимый циклодекстриновый полимер, предназначенный для доставки терапевтических агентов, к которому ковалентно присоединены множество фрагментов терапевтического агента через группы, которые расщепляются в биологической среде с высвобождением терапевтического агента, причем введение полимера пациенту приводит к их высвобождению.

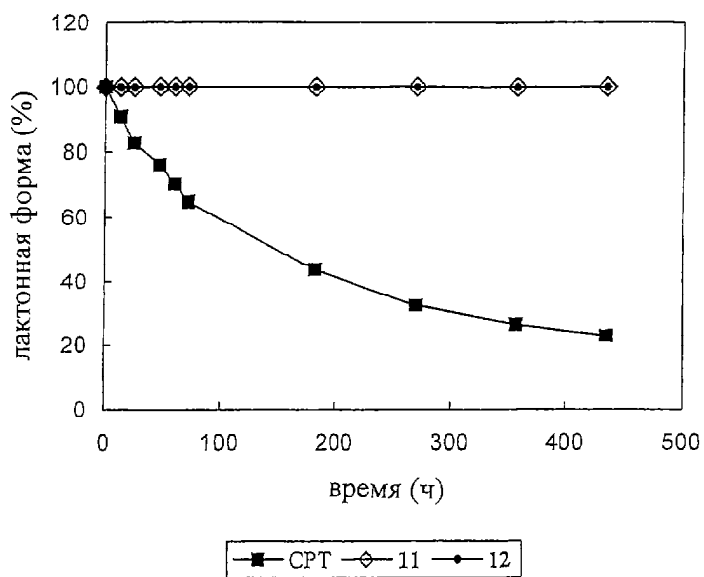


Фиг.1



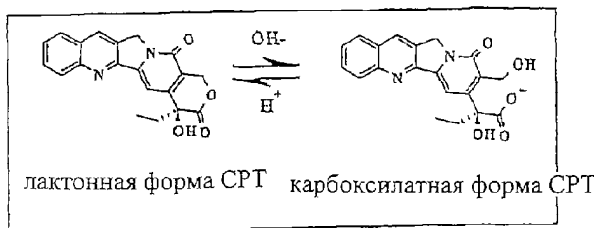
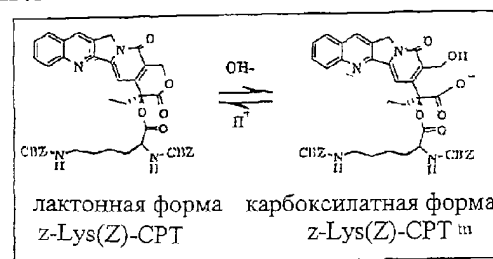
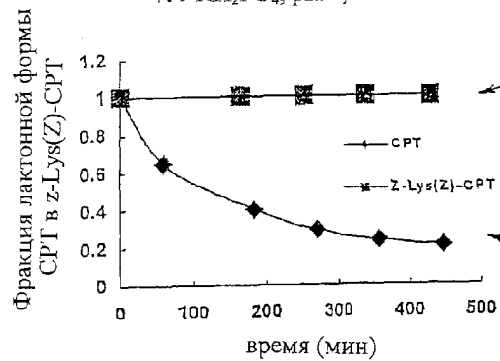
Фиг.2

Стабильность лактонного кольца СРТ, 11 и 12 в PBS (pH 7,4)



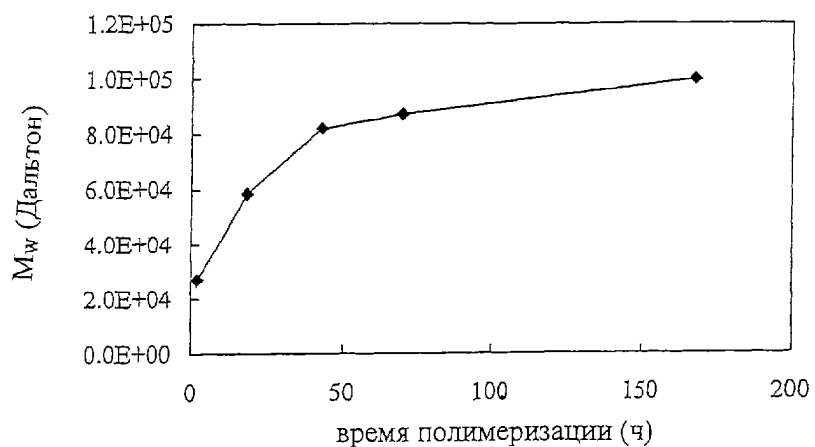
Фиг.3

Раскрытие лактонного кольца в буфере
7.4 KH_2PO_4 , pH 7,4 г



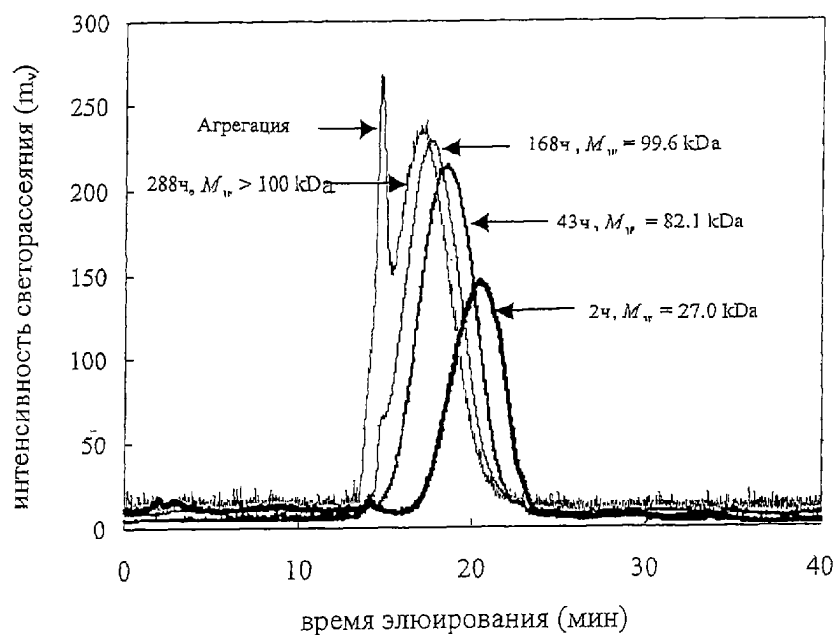
Фиг.4

Влияние продолжительности полимеризации



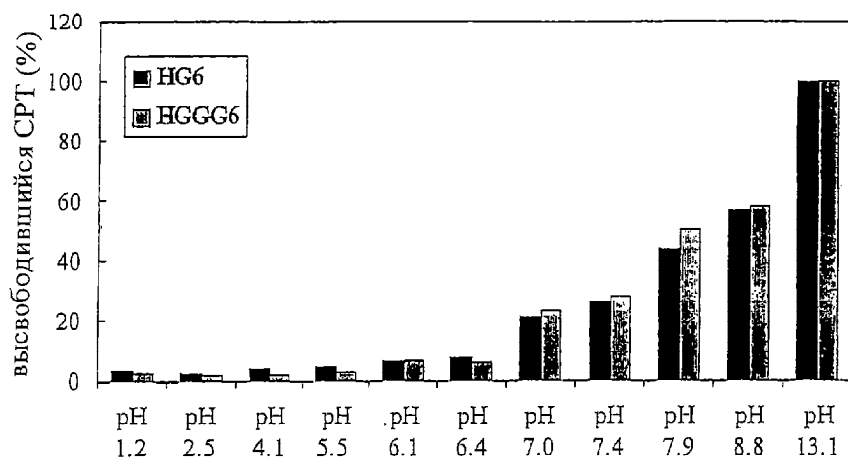
Фиг.5а

Влияние продолжительности полимеризации



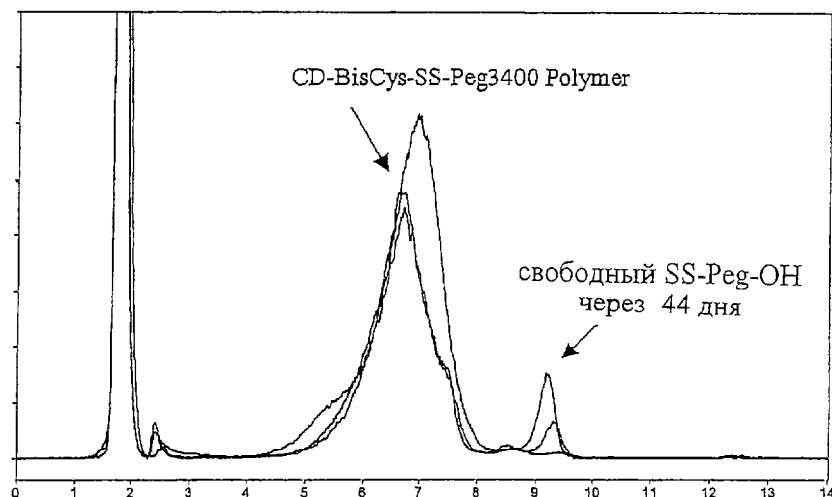
Фиг.5b

высвобождение СРТ из **HG6** и **HGGG6** при 37°C после выдержки при 37°C в течение 24 ч в буферных растворах с pH в интервале от 1,1 до 13,1



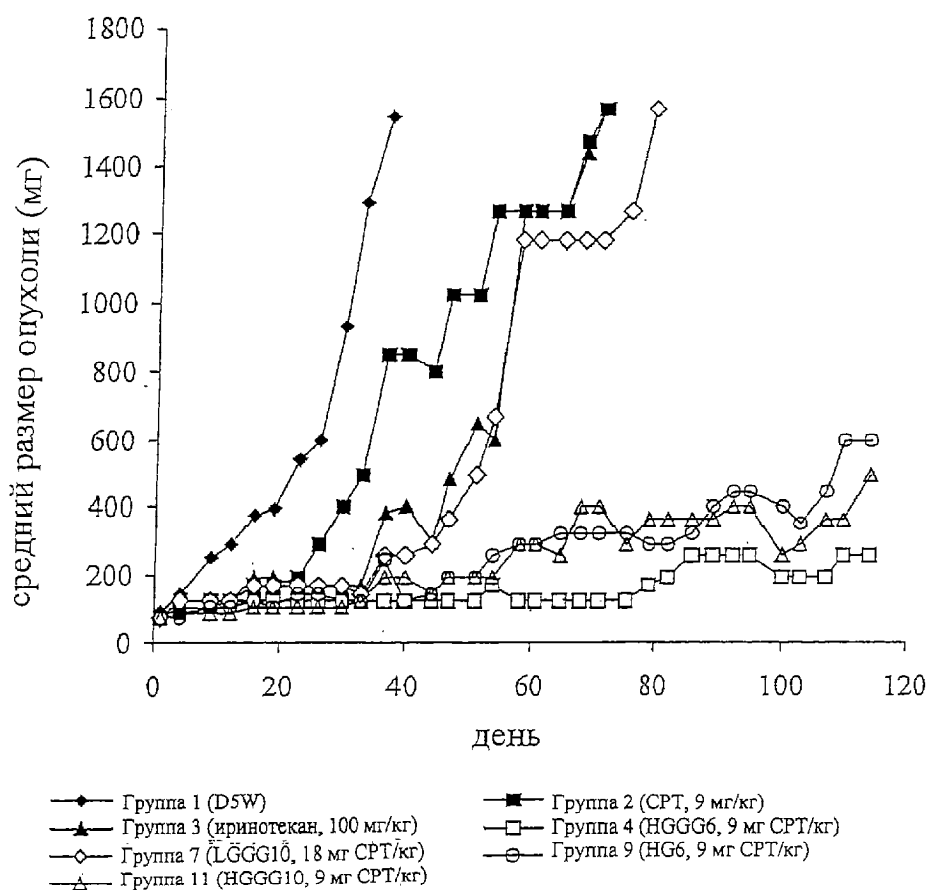
Фиг.6

Данные ЖХВР для биоразлагаемого полимера CD-БисCys-SS-Peg3400

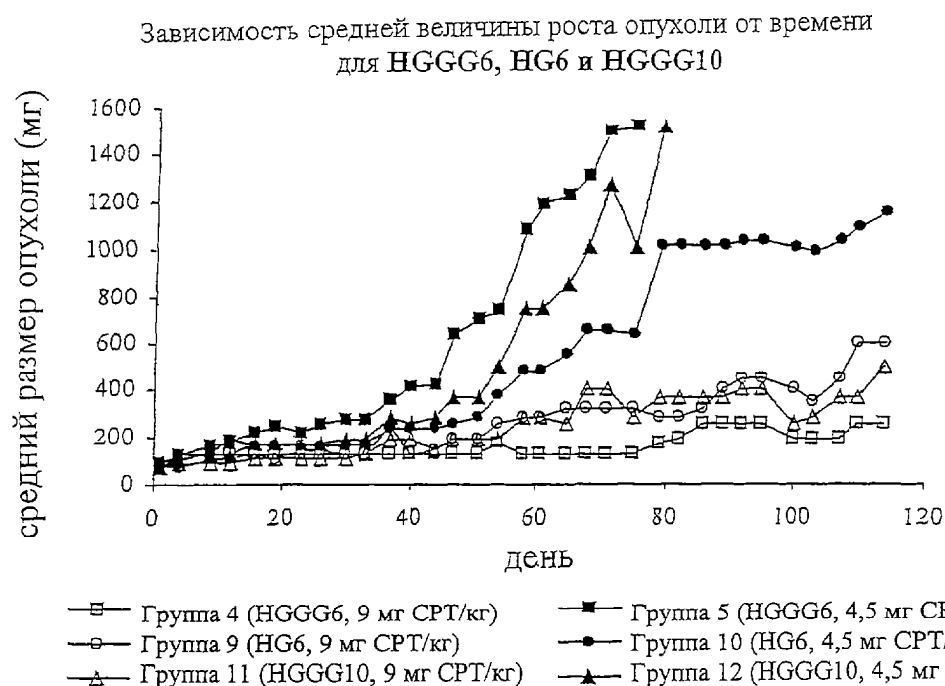


Фиг.7

Зависимость величины роста опухоли в зависимости от времени для D5W, CPT, иринотекана, LGGG10 при его максимальной нетоксичной дозе (18 мг CPT/кг) и трёх других конъюгатов с высокомолекулярным полимером (HG6G6, HG6 и HG6G10) при их MTD

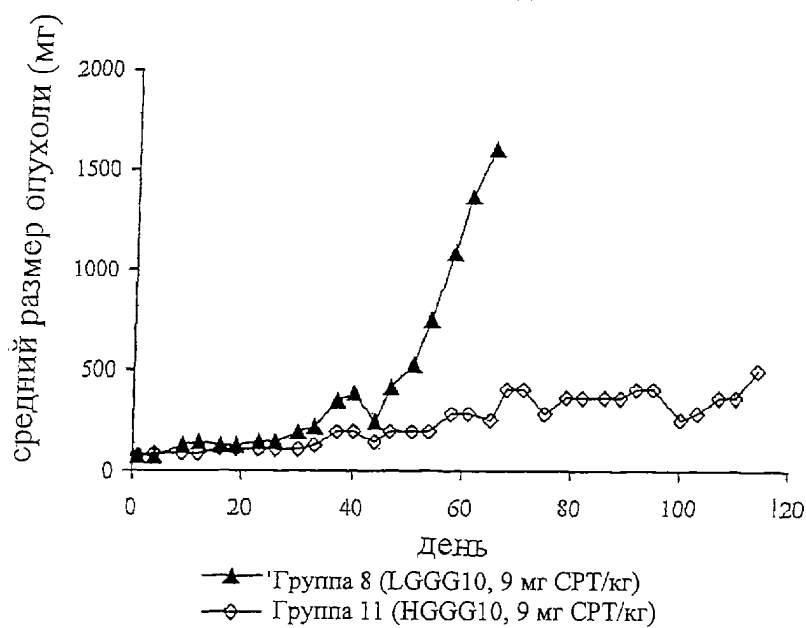


Фиг.8



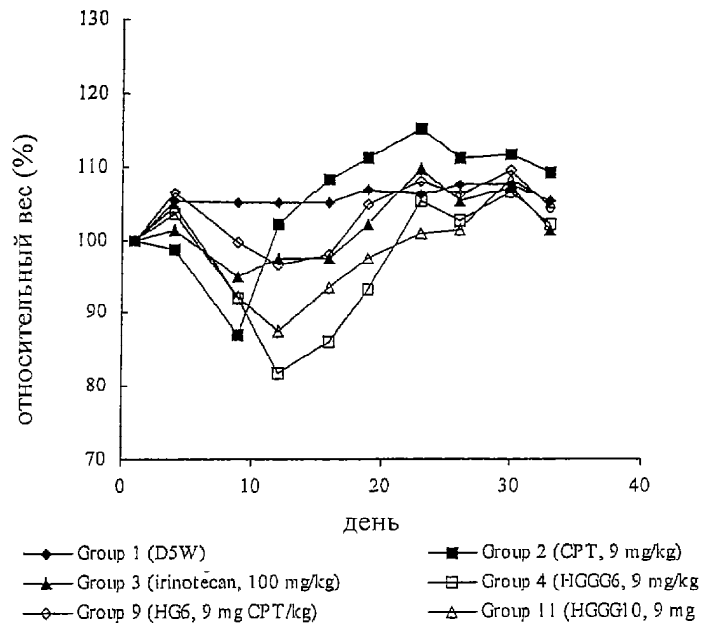
Фиг.9

Зависимость средней величины роста опухоли от времени для LGGG10
и HGGG10 при дозе 9 мг СРТ/кг для каждого



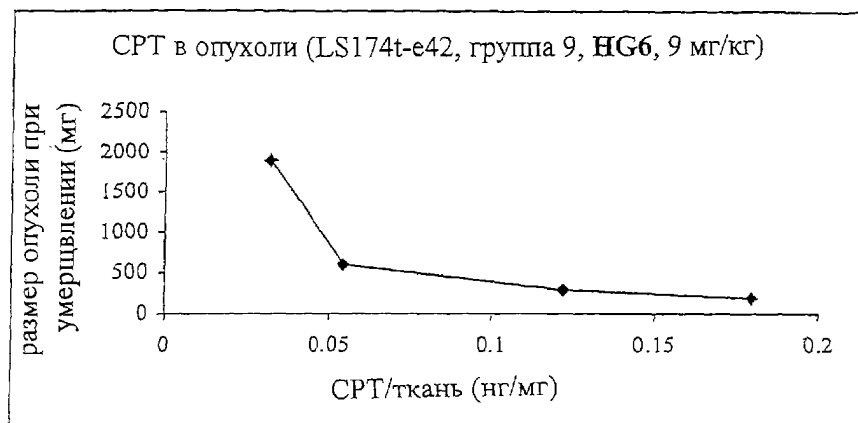
Фиг.10

Зависимость средних величин потери веса (MBW) в зависимости от времени для D5W, CPT, иринотекана, и трёх других конъюгатов содержащих высокомолекулярный полимер при их MTD.



Фиг.11

Корреляция концентрации CPT (нг/мг ткани) с размером опухоли (мг)



Фиг.12