



(51) МПК
C07D 207/09 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 207/09 (2020.02); *A61K 31/40* (2020.02); *A61K 47/55* (2020.02); *A61P 35/00* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019137590, 22.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.11.2019

Дата регистрации:
05.08.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.11.2019

(45) Опубликовано: 05.08.2020 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

123298, Москва, ул. Маршала Бирюзова, 8-3-258, Поплевиной Н.В.

(72) Автор(ы):

Мачулкин Алексей Эдуардович (RU),
 Успенская Анастасия Алексеевна (RU),
 Хазанова Елена Сергеевна (RU),
 Рыбалов Алексей Алексеевич (RU),
 Пчелинцев Светозар Олегович (RU),
 Петров Станислав Александрович (RU),
 Бер Антон Петрович (RU),
 Зык Николай Юрьевич (RU),
 Иваненков Ян Андреевич (RU),
 Скворцов Дмитрий Александрович (RU),
 Ерофеев Александр Сергеевич (RU),
 Горелкин Петр Владимирович (RU),
 Белоглазкина Елена Кимовна (RU),
 Мажуга Александр Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 "Изварино Фарма" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2697519 C1, 15.08.2019. WO 2005081711 A2, 09.09.2005. SU 1676572 A1, 15.09.1991. US 5665384 A1, 09.09.1997. Ketraware Pantub et al. "Preparation of Salicylic Acid Loaded Nanostructured Lipid Carriers Using Box-Behnken Design: Optimization, Characterization and Physicochemical Stability", Journal of Oleo Science, vol. 66(12), p.1311-1319, 2017.

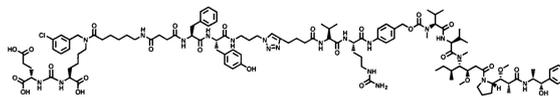
(54) КОНЬЮГАТ МОНОМЕТИЛ АУРИСТАТИНА Е ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к конъюгату формулы (I) для лечения опухолей, экспрессирующих ПСМА, включающих ПСМА-лиганд с линкером и противоопухолевый препарат ММАЕ, композиции для приготовления лиофилизата на его основе, лекарственной форме для терапии и торможения роста опухоли предстательной железы, экспрессирующей ПСМА, полученной путем лиофилизации данной композиции,

раствору для инфузий или инъекций, содержащему такую лекарственную форму, восстановленную растворителем, содержащим этиловый спирт 95% и полисорбат 80 при массовом соотношении (30-60):(70-40), соответственно. Техническим результатом заявляемой группы изобретений является высокая аффинность и селективность действия заявляемых конъюгатов в отношении клеток, экспрессирующих ПСМА. 6 н. и 6 з.п. ф-

лы, 15 ил., 27 табл., 7 пр.



(I).

R U 2 7 2 9 1 9 2 C 1

C 1 2 6 1 6 2 7 2 R U



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 207/09 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07D 207/09 (2020.02); A61K 31/40 (2020.02); A61K 47/55 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)(21)(22) Application: **2019137590, 22.11.2019**(24) Effective date for property rights:
22.11.2019Registration date:
05.08.2020

Priority:

(22) Date of filing: **22.11.2019**(45) Date of publication: **05.08.2020** Bull. № 22

Mail address:

**123298, Moskva, ul. Marshala Biryuzova, 8-3-258,
Poplevinoj N.V.**

(72) Inventor(s):

**Machulkin Aleksej Eduardovich (RU),
Uspenskaya Anastasiya Alekseevna (RU),
Khazanova Elena Sergeevna (RU),
Rybalov Aleksej Alekseevich (RU),
Pchelintsev Svetozar Olegovich (RU),
Petrov Stanislav Aleksandrovich (RU),
Ber Anton Petrovich (RU),
Zyk Nikolaj Yurevich (RU),
Ivanenkov Yan Andreevich (RU),
Skvortsov Dmitrij Aleksandrovich (RU),
Erofeev Aleksandr Sergeevich (RU),
Gorelkin Petr Vladimirovich (RU),
Beloglazkina Elena Kimovna (RU),
Mazhuga Aleksandr Georgievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obschestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Izvarino Farma" (RU)**

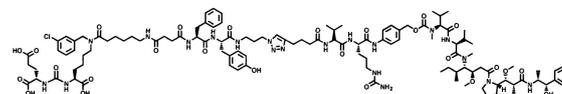
(54) **MONOMETHYL AURISTATIN E CONJUGATE FOR PREPARING A COMPOSITION FOR TREATING PROSTATE CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a conjugate of formula (I) for treating tumors expressing PSMA, including a PSMA ligand with a linker and an anti-tumor preparation MMAE, a composition for preparing a lyophilizate based thereon, dosage form for therapy and inhibition of growth of prostate tumor expressing PSMA, obtained by lyophilisation of said composition, solution for infusions or injections containing such a dosage form, reduced with a solvent containing ethyl alcohol 95 % and polysorbate 80 at weight ratio

(30–60):(70–40), respectively.



(I).

EFFECT: technical result of claimed group of inventions is high affinity and selectivity of action of disclosed conjugates in relation to cells expressing PSMA.

12 cl, 15 dwg, 27 tbl, 7 ex

Область применения

Изобретение относится к области органической и медицинской химии, онкологии и касается нового класса соединений для лечения опухолей, экспрессирующих ПСМА, в том числе опухолей предстательной железы.

5 Уровень техники

Раковые заболевания являются следствием неконтролируемого роста клеток в различных тканях. Во многих случаях новые клетки проникают в существующую ткань (инвазивный рост) или метастазируют в отдаленные органы. Раковые заболевания возникают в различных тканях и органах, и заболевание часто протекает
10 неспецифическим образом. Соответственно обозначение "раковое заболевание" как родовое понятие охватывает большую группу определенных заболеваний различных органов, тканей и типов клеток.

На ранних стадиях опухоли поддаются удалению хирургическими и химиотерапевтическими средствами. При метастазирующих опухолях обычно можно
15 лишь назначить паллиативное лечение химиотерапевтическими агентами. В этом случае целью является улучшение качества жизни и увеличение продолжительности жизни.

Большинство химиотерапевтических агентов, которые в настоящее время вводят парентеральным путем, часто не оказывает направленного действия на мишень в опухолевой ткани или в опухолевых клетках, а из-за системного введения распределяется
20 в организме неспецифичным образом, попадая, соответственно, в участки, где воздействие лекарственного средства нежелательно, такие как здоровые клетки, ткани и органы, например. Это может привести к нежелательным побочным эффектам и даже к тяжелым эффектам общей токсичности, что часто сильно ограничивает терапевтически применимые диапазоны доз лекарственных средств или является причиной
25 необходимости полного прекращения лечения.

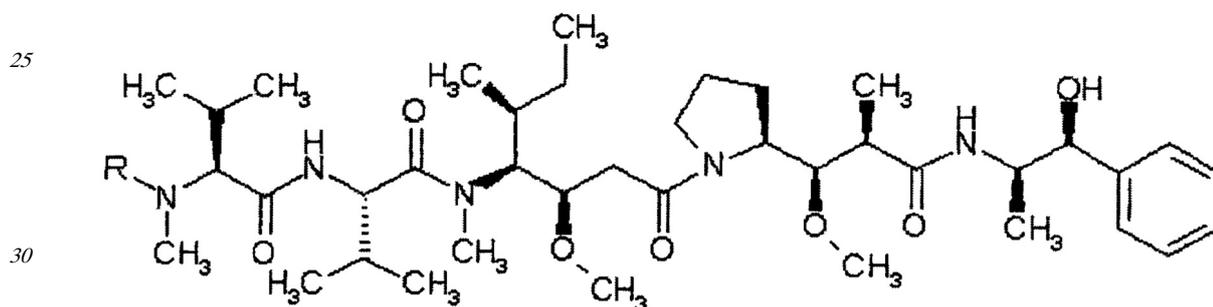
Таким образом, улучшенная и селективная доставка этих химиотерапевтических агентов в опухоль или ткани в непосредственной близости от нее и соответствующее усиление эффекта, с одной стороны, и минимизация побочных токсических эффектов с другой стороны, на протяжении нескольких лет являются центральной задачей
30 разработки новых химиотерапевтических агентов. К настоящему времени уже было предпринято много попыток разработать эффективный способ введения активного соединения в клетку-мишень. Оптимизация связывания активного соединения и внутриклеточной мишени и минимизации внутриклеточного распределения активного соединения, например, в соседних клетках, все еще составляют трудную задачу.

Моноклональные антитела, например, подходят для мишень-направленного воздействия на опухолевые ткани или опухолевые клетки. За последние годы значение таких антител для клинического лечения раковых заболеваний значительно возросло благодаря активности таких агентов как трастузумаб (Herceptm), ритуксимаб (Rituxan),
40 цетуксимаб (Erbix) и бевацизумаб (Avastin), которые одобрены для лечения отдельных конкретных опухолевых заболеваний [см., например, G.P. Adams and L.M. Weiner, Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157 (2005)]. Соответственно, сильно повысился интерес к так называемым иммуноконъюгатам, таким как, например, указанные выше конъюгаты связывающее соединение - активное соединение (ADC), в которых интернализирующееся антитело к опухоль-ассоциированному антигену ковалентно связано связывающим
45 фрагментом ("линкером") с цитотоксическим агентом. После введения ADC в опухолевую клетку и последующего расщепления конъюгата, либо сам цитотоксический агент, либо другой метаболит, образованный из цитотоксического агента и обладающий цитотоксической активностью, высвобождается внутри опухолевой клетки, где действует

прямо и селективно. Это позволяет удерживать повреждение нормальной ткани в существенно более узких рамках по сравнению с обычной химиотерапией раковых заболеваний [см., например, J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 543-549 (2005); A.M. Wu and P.D. Senter, *Nat. Biotechnol.* 23, 1137-1146 (2005); P.D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 235-244 (2009); L. Ducry and B. Stump, *Bioconjugate Chem.* 21, 5-13 (2010)].

Вместо антител также возможно использовать таргетные соединения из области низкомолекулярных лекарственных средств, которые специфично связываются с мишенью, расположенной в определенной области, например, с рецептором [см., например, E. Ruoslahti et al., *Science* 279, 377-380 (1998); D. Karkan et al, *PLoS ONE* 3 (6), e2469 (June 25, 2008)]. Также известны конъюгаты цитотоксических активных соединений и нацеливающих лигандов, которые характеризуются определенно и точкой расщепления между лигандом и лекарственным средством для высвобождения активного соединения. "Заранее определенная точка расщепления" этого типа может существовать, например, в пептиде, который может селективно расщепляться в определенном участке под действием фермента в месте действия активного соединения [см., например, R.A. Firestone and L.A. Telan, Заявка на патент США US 2002/0147138].

Ауристин Е (АЕ) и монометил ауристин Е (ММАЕ) являются синтетическими аналогами доластатинов, специфичной группы линейных псевдопептидов, которые первоначально были выделены из морских источников и в некоторых случаях обладают очень высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток [обзор можно найти, например, в G.R. Pettit, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70, 1-79 (1997); G.R. Pettit et al., *Anti-Cancer Drug Design* 10, 529-544 (1995); G.R. Pettit et al, *Anti-Cancer Drug Design* 13, 243-277 (1998)].



Ауристин Е (АЕ): R = CH₃

Монометилауристин Е (ММАЕ): R = H

ММАЕ, однако, обладает недостатком, заключающимся в относительно высокой системной токсичности. Для улучшения селективности в отношении опухоли ММАЕ используют в комбинации с ферментативно расщепляемыми линкерами валин-цитрулин в конъюгате связывающее соединение - активное соединение для более направленной терапии опухоли [WO 2005/081711-A2; S.O. Doronina et al., *Bio-conjugate Chem.* 17, 114-124 (2006)]. После протеолитического расщепления ММАЕ высвобождается из соответствующего конъюгата связывающее соединение - активное соединение внутри клетки.

Однако, при применении в форме конъюгатов антитело-активное соединение (ADC), ММАЕ не совместим со связывающими фрагментами (линкерами) между антителом и лекарственным средством, которые не содержат точки ферментативного расщепления [S.O. Doronina et al, *Bio-conjugate Chem.* 17, 114-124 (2006)].

В качестве примера конъюгата лиганд-лекарственное средство может быть приведен недавно одобренный в качестве терапевтического средства при лимфоме Ходжкина и

анапластической крупноклеточной лимфоме, адцетрис (брентуксимаб ведотин), в котором ауристин Е конъюгирован с анти-CD30 антителом. Данный препарат оказался эффективным для лечения лимфомы Ходжкина и анапластической крупноклеточной лимфомы. Так же в качестве примера конъюгата лиганд-лекарственное может быть
5 приведен Полатузумаб ведотин - конъюгат анти-CD79b антитела и лекарственного препарата (ADC). Белок CD79b является высокоспецифичным и экспрессируется при большинстве типов В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ), поэтому он является перспективной мишенью при разработке новых препаратов [Emma D.D Polatuzumab Vedotin: First Global Approval Drugs (2019) 79:1467-1475]. Полатузумаб ведотин связывается
10 с CD79b, инициируя интернализацию терапевтического средства (монометил ауристин Е (ММАЕ)) в В-клетку. Однако, данные конъюгаты не применимы для лечения опухолей предстательной железы из-за отсутствия специфического аффинитета к клеткам и тканям предстательной железы. Рак предстательной железы (РПЖ) - это наиболее распространенный вид рака у мужчин в развитых странах и третий по частоте
15 возникновения рак в мире. Смертность от РПЖ составляет 7,1 на 100 тыс.населения и за последние 12 лет возросла на 42%. При этом РПЖ является одной из главных причин смертности мужского населения, как в России, так и во всем мире.

В соответствии с высокой потребностью в разработке препаратов с высокой эффективностью и сниженной токсичностью, адресная терапия является
20 высокоприоритетным направлением. Недостатком решения с использованием антитела в качестве лиганда является низкая массовая загрузка конъюгата действующим веществом, сниженная стабильность высокомолекулярного антитела и всего конъюгата и высокая стоимость биопрепаратов. Таким образом, целью данной разработки, является получение конъюгата ММАЕ с низкомолекулярным лигандом с высоким аффинитетом
25 к клеткам предстательной железы пригодного для адресной доставки и терапии опухолей предстательной железы.

Раскрытие изобретения

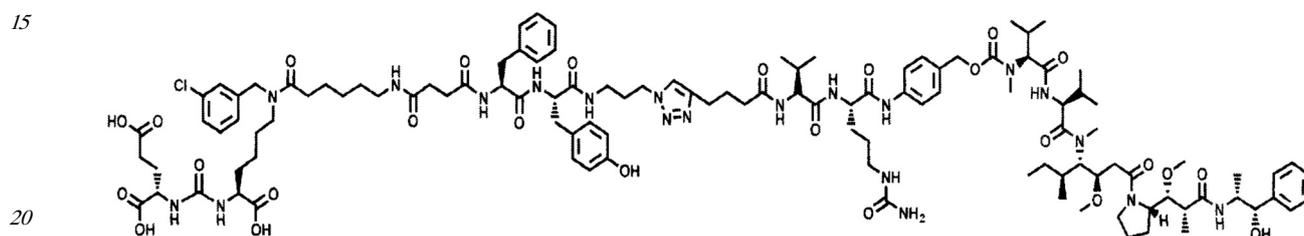
Технической проблемой, на решение которой направлено изобретение является разработка новых терапевтических соединений для терапии опухолей предстательной
30 железы, экспрессирующих ПСМА, включающих ПСМА-лиганд с линкером, описанный в RU2697519, и противоопухолевый препарат монометил ауристин Е (ММАЕ), способ его получения и применения.

Описание ПСМА-лиганда с линкером, используемого в этом изобретении представлено в описании патента RU2697519, в котором данное соединение имеет номер
35 70. Это описание следует считать полностью включенным в описание данного изобретения. Техническим результатом заявляемой группы изобретений является высокая аффинность и селективность действия заявляемых конъюгатов в отношении клеток, экспрессирующих ПСМА. Данные конъюгаты позволяют расширить арсенал терапевтических средств для терапии опухолей предстательной железы с высокой
40 экспрессией ПСМА, позволяющих добиться селективного связывания с раковыми клетками и достичь высокой эффективности воздействия на опухоль. Результаты наших исследований показали, что эффективное торможение роста опухоли (ТРО) с помощью заявляемого конъюгата достигается в дозе около 0,3 мг/кг. Данная дозировка сопоставима с дозировками ММАЕ, используемыми в коммерческих препаратах,
45 описанных выше.

Использование азидопроизводного аминокислоты при синтезе заявляемых конъюгатов позволяет получить ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбокси-группами, что в свою очередь облегчает его

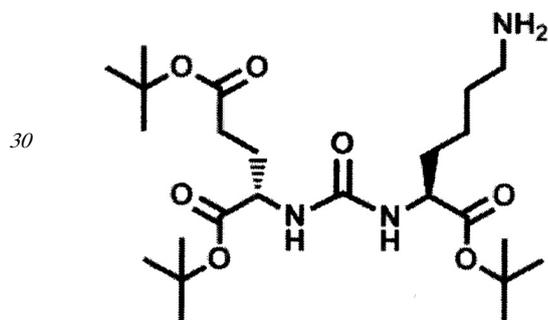
модификацию и снижает количество используемых в процессе растворителей вследствие значительного увеличения растворимости исходного соединения (ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбокси-группами).

5 Ключевой особенностью заявляемого конъюгата является наличие в структуре длинного гидрофобного линкера, а также дополнительных ароматических фрагментов, наличие которых, способствует лучшему связыванию заявляемого конъюгата с белковой мишенью, за счет вовлечения дополнительных взаимодействий между конъюгатом и гидрофобными карманами в структуре гидрофобного туннеля белковой мишени. Техническая проблема решается соединением для терапии опухолей предстательной
10 железы, экспрессирующих ПСМА, представляющим собой ковалентно-связанные ПСМА-связывающий лиганд на основе производного мочевины структуры DCL и модифицированный гидрофобный пептидный линкер, включающий фрагмент 6-аминогексановой кислоты, связанный с противоопухолевым веществом ММАЕ формулы (I):



(I)

Поставленная проблема также решается способом получения соединения для терапии опухолей предстательной железы, экспрессирующих ПСМА (PSMA) Конъюгат (I),
25 включающим синтез тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда формулы (III):

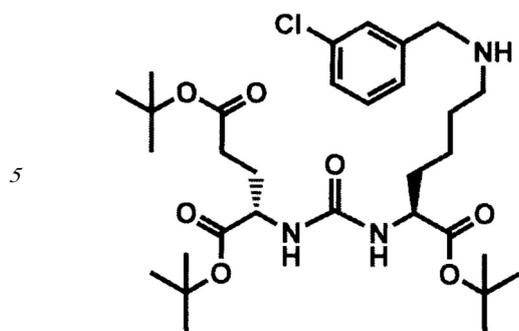


(III),

с последующим алкилированием полученного тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда с получением соединения формулы (IV):

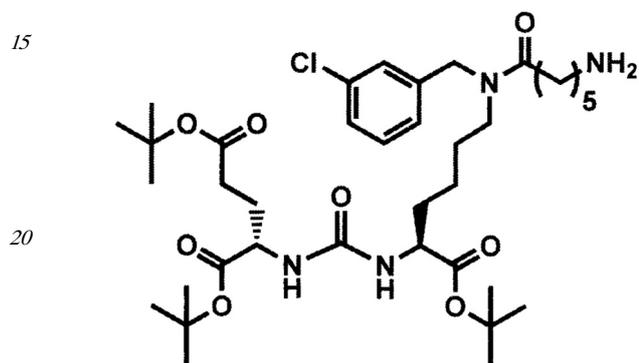
40

45



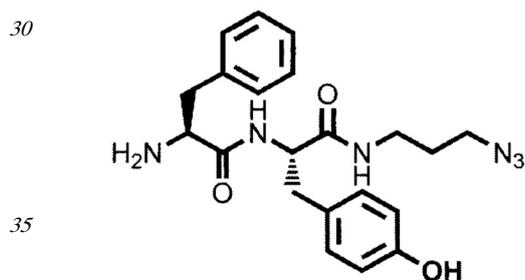
(IV),

с последующим получением соединения, содержащего алкилированное тритретбутил производное ПСМА-лиганда и фрагмент линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода формулы (V):



(V),

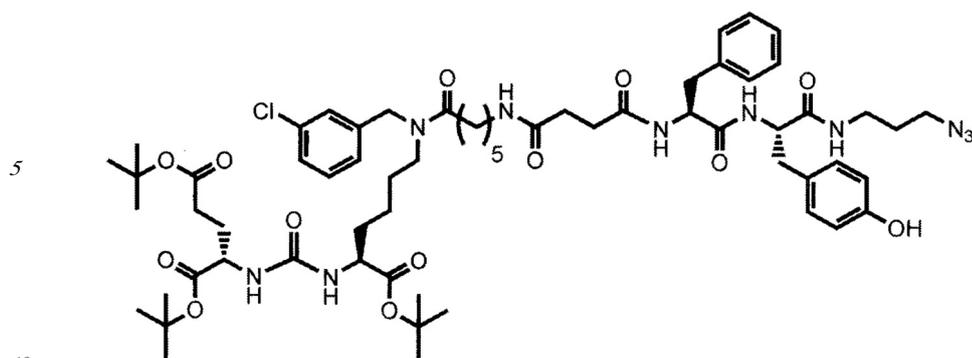
25 который модифицируют янтарным ангидридом, с получением производного соединения ацилированного, далее осуществляют получение дипептидов производных ароматических аминокислот, представляющих собой L-фенилаланил-L-тирозин формулы (VI), для связывания с модифицированным фрагментом линкера,



(VI)

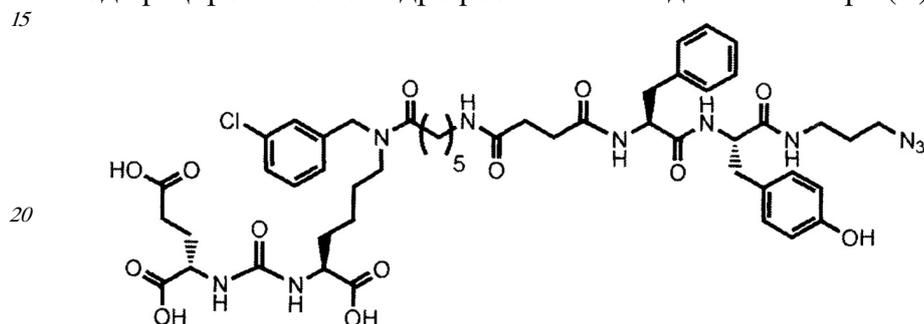
40 затем получают тритретбутил производное конъюгата радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, включающего фрагменты 6-аминогексановой кислоты, фрагмент L-фенилаланина, фрагмент L-тирозина формулы (VII):

45



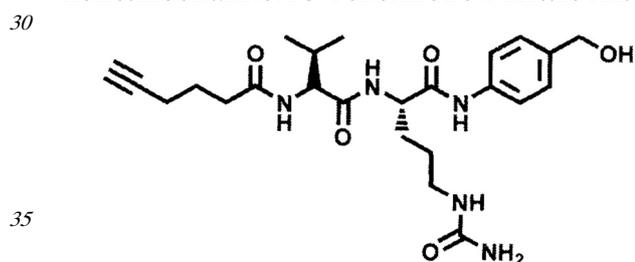
(VII)

с последующим удалением трет-бутильных защитных групп соединения формулы (VII) с получением ковалентно-связанных ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера (II).



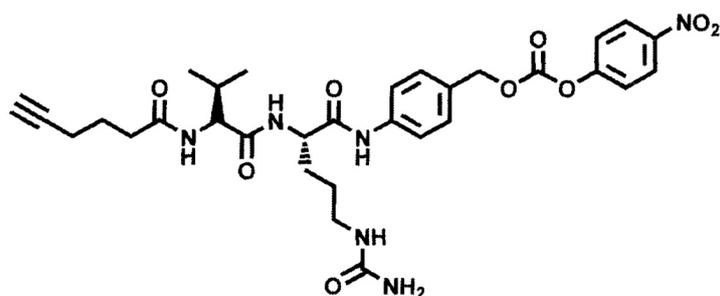
(II)

25 Получение модифицированного MMAE (X) осуществляется с использованием протеолитически-расщепляемого дипептидного линкера на основе валил-цитруллина, содержащего фрагмент *n*-аминобензилового спирта (Val-Cit-PAB). На первом этапе осуществляется реакция ацилирования пептидного производного Val-Cit-PAB с использованием 5-гексиновой кислоты:



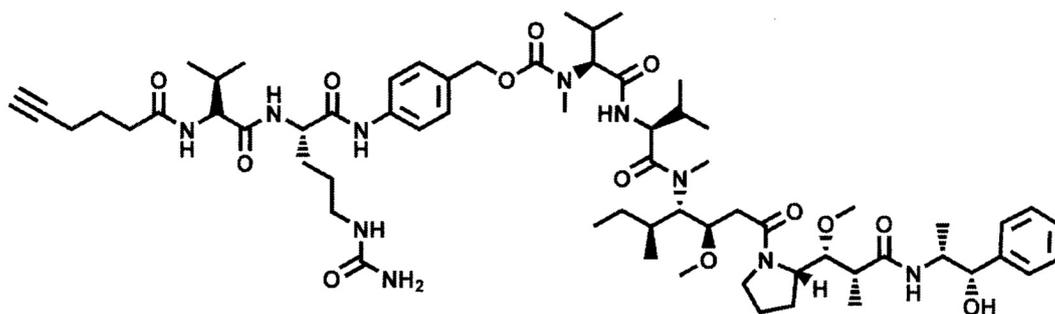
(VIII)

40 затем модифицируют гидроксильную группы *n*-аминобензилового фрагмента с использованием бис-(4-нитрофенил) карбоната:



(IX)

с последующим взаимодействием полученного соединения (IX) с монометил ауристатином E:



(X)

Далее проводят реакцию медь (I) катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения соединения (II) с модифицированным производным монометил ауристатина E, содержащим терминальную тройную связь, что приводит к получению целевого соединения (I) (L. Liang, D. Astruc The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview Coordination Chemistry Reviews, 255 (2011) 2933-2945).

При этом получение алкилированного тритретбутил производного ПСМА-лиганда осуществляют путем восстановительного аминирования м-хлорбензальдегидом, получение соединения формулы (V) проводят путем ацилирования производными 6-азидогексановой кислоты с получением азидного производного алкилированного производного ПСМА-лиганда с последующей реакцией восстановления азидо до аминогруппы. Реакцию восстановления азидо до аминогруппы проводят в присутствии трифенилфосфина и воды в растворе ТГФ, либо в растворе метанола с использованием водорода в присутствии палладия на углероде в качестве катализатора. Модификацию янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода, осуществляют реакцией ацилирования янтарным ангидридом аминогруппы в присутствии ненуклеофильных оснований, в качестве которых используют диизопропилэтиламин или триэтиламин. Получение тритретбутил производного конъюгата формулы (VII) осуществляют реакцией ацилирования производным соединения (V), ацилированного янтарным ангидридом, дипептида формулы (VI), а удаление тритретбутильных защитных групп проводят в присутствии 9-11% ТФУ в течение 15-17 часов в дихлорметане.

Получение модифицированного производного Val-Cit-PAВ (VIII) проводят с помощью реакции ацилирования 5-гексиновой кислотой. Дальнейшую модификацию проводят с использованием бис(4-нитрофенил) карбоната, с последующей реакцией с ММАЕ. Реакцию медь (I) катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения соединения (II) с флуоресцентным красителем, содержащим терминальную тройную связь проводят,

что приводит к получению целевого соединения (I) (L. Liang, D. Astruc The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview Coordination Chemistry Reviews, 255 (2011) 2933-2945).

5 Поставленная проблема также решается композицией для терапии опухолей предстательной железы, экспрессирующих ПСМА (PSMA), включающая конъюгат формулы (I) и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется следующими чертежами, где:

10 На фиг. 1 представлен спектр ЯМР ^1H Конъюгата (I) (ось абсцисс - химический сдвиг (м.д.), ось ординат - нормализованная интенсивность).

На фиг. 2 показана ВЭЖХ-хроматограмма соединения Конъюгата (I). пик 1: время удерживания 11,2, содержание (%): 0,350; пик 2: время удерживания 12,6, содержание (%): 0,359; пик 3: время удерживания 13,2, содержание (%): 96,3; пик 4: время удерживания 13,5, содержание (%): 0,953; пик 5: время удерживания 13,9, содержание (%): 1,130; пик 6: время удерживания 14,8, содержание (%): 0,361.

На фиг. 3 представлен масс-спектр ESI HRMS соединения Конъюгата (I) (ось абсцисс - соотношение масса/заряд (m/z), ось ординат - интенсивность).

20 На фиг. 4 представлен ИК-спектр соединения Конъюгата (I) (ось абсцисс - длина волны (cm^{-1}), ось ординат - интенсивность поглощения).

На фиг. 5 представлена динамика роста рака предстательной железы 22Rv1 под действием 3-кратного внутривнутрибрюшинного введения Конъюгата (I) в дозе 0,3 мг/кг по сравнению с контролем (КРО) (ось ординат - средний объем опухоли (мм³), ось абсцисс - сутки после трансплантации опухоли (кол-во суток).

25 На фиг. 6 представлена выживаемость мышей с лимфолейкозом P388 после внутривнутрибрюшинного введения Конъюгата (I) в дозе 0,5 и 1 мг/кг по сравнению с контролем (КРО) (ось ординат - количество мышей (штук), ось абсцисс - сутки после начала лечения (кол-во суток).

30 На фиг. 7 представлены средние фармакокинетические профили при исследовании на кроликах (в линейных и полулогарифмических координатах). Ось ординат - концентрация Конъюгата (I) (мкг\мл), ось абсцисс - время (час).

На фиг. 8 представлены средние фармакокинетические профили при исследовании на крысах (в линейных и полулогарифмических координатах). Ось ординат - концентрация Конъюгата (I) (мкг\мл), ось абсцисс - время (час).

35 Осуществление изобретения

Ниже приведены определения терминов, которые используются в описании настоящего изобретения.

40 «ПСМА (PSMA)» - простатический специфический мембранный антиген трансмембранный гликопротеид II типа с массой ~100 кДа, состоящий из 750 аминокислот. Данный белок состоит из короткого внутриклеточного участка (1-18 аминокислоты), трансмембранного домена (19-43 аминокислоты) и большого внеклеточного домена (44-750 аминокислоты). Данный белок обладает высокой экспрессией в тканях предстательной железы, в связи с этим является перспективной мишенью для адресной доставки.

45 EDC*HCl - 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид

PFPHOH - пентафторфенол

НОВТ - гидроксibenзотриазол

НВТУ - 3-[Бис(диметиламино)метилиумил]-3Н-бензотриазол-1-оксид гексафторфосфат

EtOAc/MeOH - этилацетат/метанол

DMAP - 4-диметиламинопиридин

DCM - дихлорметан

DIC - диизопропилкарбодиимид

DMF - ДМФА

5 DIPEA - диизопропилэтиламин

TFA - трифторуксусная кистота

ДХМ - дихлорметан

PBS - натрий-фосфатный буфер

FBS - фетальная телячья сыворотка

10 PPh₃ - трифенилфосфин

PuBOP - бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат

THF - тетрагидрофуран

BOC₂O - ди-третбутил дикарбонат

KPO - контроль роста опухоли

15 MMAE - метил ауристатин E

ИПО - индекс прироста опухоли

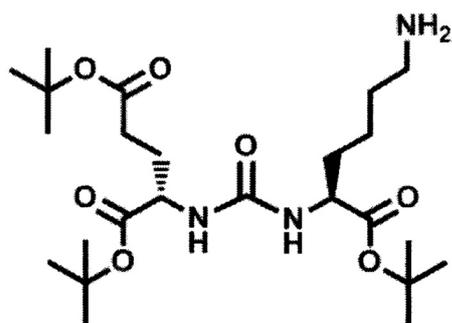
TPO - торможение роста опухоли

в/б - внутрибрюшинно

V_{ср} - средний объем

20 Все используемые реагенты являются коммерчески доступными, выпаривание растворителя осуществляли с использованием роторного испарителя, при пониженном давлении при температуре бани не более 50°C; контроль за ходом реакции осуществляли при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ), и время реакции указано только для иллюстрации; структуру и чистоту всех выделенных соединений подтверждали, по
25 меньшей мере, одним из следующих методов: ТСХ (пластины для ТСХ с предварительно нанесенным силикагелем 60 F₂₅₄ Merck), масс-спектрометрия или ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Выход продукта приведен только для иллюстрации. Колоночную флэш-хроматографию осуществляли, используя Merck силикагель 60 (230-400 меш
30 ASTM). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) положительных ионов зарегистрирован на спектрометре Jeol GCMate II при энергии ионизации 70 eV. Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance-400 (рабочая частота 400.1 и 100.6 МГц для ¹H и ¹³C, соответственно) и Agilent 400-MR (рабочая частота 400.0 и 100.6 МГц
35 для ¹H и ¹³C, соответственно), используя дейтерированный хлороформ (99,8% D) или ДМСО (99,9% D) в качестве растворителя, если не указано иное, относительно тетраметилсилана (TMS) в качестве внутреннего стандарта, миллионных долях (м.д.); обычные используемые сокращения следующие: с - синглет, д - дублет, т - триплет, кв -квартет, м - мультиплет, шир. - широкий и так далее.

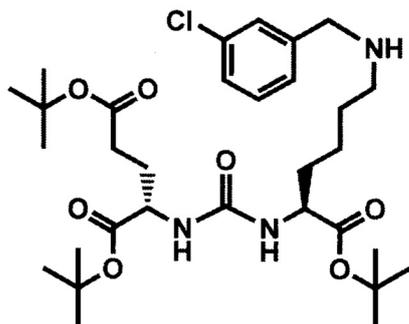
40 Сначала получают тритретбутиловое производное ПСМА-связывающего лиганда формулы (III):



(III)

Соединение формулы (III) может быть получено известным из уровня техники способом (Ryan P. Murelli, Andrew X. Zhang, Julien Michel, William L. Jorgensen, David A. Spiege. Chemical Control Over Immune Recognition: A Class of Antibody-Recruiting Molecules (ARMs) that Target Prostate Cancer. J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 17090-17092) (Фиг. 9). Затем полученное тритретбутиловое производное ПСМА-связывающего лиганда алкилируют с получением соединения формулы (IV). Реакцию алкилирования проводят путем восстановительного аминирования с м-хлорбензальдегидом (Jan Tukyart, Jiří Schimer, Jitka Bařinková, Petr Pachl, Lenka Pořtová-Slavětínská, Pavel Majer, Jan Konvalinka, Pavel Šácha. Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCP II)

inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery. Bioorg Med Chem. 2014, 22(15):4099-108.)



(IV),

Получение соединения формулы (V) проводят путем ацилирования производными 5-азидогексановой кислоты с получением азидного производного алкилированного производного ПСМА-лиганда (V) с последующей реакцией восстановления азидо до аминогруппы, при этом реакцию восстановления азидо до аминогруппы проводят в присутствии трифенилфосфина и воды в растворе ТГФ или в растворе метанола с использованием водорода в присутствии палладия на углеводе в качестве катализатора.

Реакцию ацилирования проводят в среде полярного апротонного растворителя растворяют исходный амин (IV), азидо-кислоту и ненуклеофильное основание, взятые из расчета, что на 1 мольный эквивалент амина берут по меньшей мере 1 мольный эквивалент азидокислоты и основания, а также не менее 100 мольных эквивалента полярного апротонного растворителя, к полученной смеси при перемешивании добавляют по меньшей мере 1 мольный эквивалент Р₃ВОР, полученную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного амина (IV).

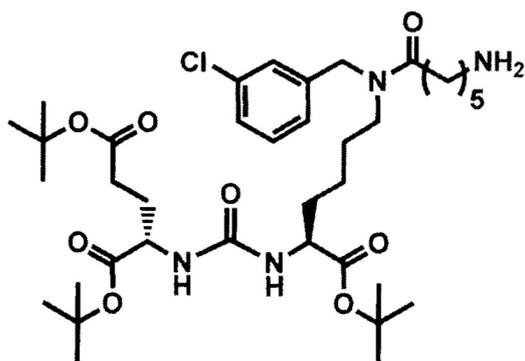
Далее из полученной реакционной смеси удаляется растворитель при пониженном

давлении, и целевой полупродукт выделяется с помощью колоночной хроматографии (Puriflach SILICA-HP 120G, 50 мкм, градиент от 100% петролейного эфира до 100% EtOAc в течение 30 мин, скорость потока = 50 мл/мин). Верхняя граница используемых реагентов не ограничивается, т.к. избыток какого-либо реагента не уменьшает выходов реакций, однако при большом избытке может понадобиться дополнительная очистка продуктов реакций.

Далее реакцию восстановления азидо-группы до аминогруппы в среде ТГФ/вода с содержанием воды по меньшей мере 10 об. % в которой растворяют полученное азидо-производное и трифенилфосфин, взятые из расчета, что на 1 мольный эквивалент азидо-производного берут по меньшей мере 1,5 мольных эквивалента трифенилфосфина, а также не менее 50 мольных эквивалентов смеси растворителей (ТГФ/вода) из расчета на воду. Реакционную смесь нагревали при температуре не менее 45°C до исчезновения исходного азидо-производного. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Очистку проводили методом колоночной хроматографии (триэтиламин: хлористый метилен: метанол; от 1%:98%:1% до 1%:89%:10%) (Фиг. 10).

Предпочтительно использовать в качестве полярного апротонного растворителя ДМФА или ДМСО.

Предпочтительно использовать в качестве ненуклеофильного основания диизопропилэтиламин или триэтиламин.



(V)

Модификация янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода с получением производного соединения (V), ацилированного янтарным ангидридом. При этом модификацию янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 3-5 атомов углерода, осуществляют реакцией ацилирования янтарным ангидридом аминогруппы в присутствии ненуклеофильных оснований. В качестве ненуклеофильных оснований используют диизопропилэтиламин или триэтиламин.

Реакцию ацилирования янтарным ангидридом проводят в среде неполярного апротонного растворителя путем растворения исходного амина (V), янтарного ангидрида и ненуклеофильного основания, взятых из расчета, что на 1 мольный эквивалент амина берут по меньшей мере 1 мольный эквивалент янтарного ангидрида и ненуклеофильного основания, а также не менее 100 мольных эквивалента неполярного апротонного растворителя, полученную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного амина (V).

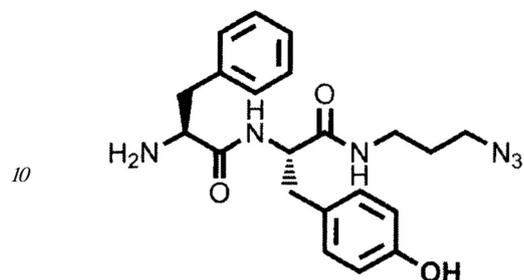
Предпочтительно использовать в качестве неполярного апротонного растворителя дихлорметан или хлороформ.

Предпочтительно использовать в качестве ненуклеофильного основания

диизопропилэтиламин или триэтиламин.

Получение дипептидов производных ароматических аминокислот, представляющих собой фенилаланил-тирозин, для связывания с модифицированным фрагментом линкера соединения формулы (V).

5 Синтез дипептида (VI) проиллюстрирован на схеме, приведенной на Фиг. 11.



(VI)

15 Синтез ПСМА-векторного фрагмента на основе производного дипептида L-фенилаланил-L-тирозина (L-Phe-L-Tyr, VI) осуществлялся по схеме (Фиг. 11). К суспензии L-фенилаланина в смеси растворителей диоксан - вода с содержанием воды не менее 40 об. %, при температуре не более 5°C добавляли основание в количестве не менее одного мольного эквивалента и ди-трет-бутил дикарбонат BOC_2O в количестве не

20 менее одного мольного эквивалента. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение не менее 4 суток. Реакционную смесь концентрировали в вакууме роторного испарителя до удаления органического растворителя. Затем в водный остаток добавляли раствор соляной кислоты с концентрацией не менее 1 моль/л, до pH не более 4 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали

25 насыщенным раствором NaHCO_3 и NaCl , сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Затем повторно переупаривали с дихлорметаном. Продукт реакции получали в виде бесцветного аморфного вещества.

Предпочтительно в качестве основания использовать гидрокарбонат натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия или гидроксид калия.

30 К раствору соединения BOC-L-Phe в дихлорметане добавляли $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (не менее 1 экв.), PFPOH (не менее 1 экв.) и перемешивали в течение не менее 12 часов при комнатной температуре. Дальнейшую очистку проводили с помощью колоночной хроматографии на колонке с силикагелем (элюент - дихлорметан), после чего полученную фракцию концентрировали в вакууме. Продукт реакции (желтое маслянистое вещество),

35 растворяли в смеси ТГФ - вода (не менее 30 об. % воды) и добавляли при перемешивании L-тирозин (не менее 1 экв.). К полученному раствору прикапывали раствор ненуклеофильного основания (не менее 1 экв.) и перемешивали в течение не менее 12 часов при комнатной температуре. По окончании реакции реакцию концентрировали в вакууме роторного испарителя до полного удаления органического

40 растворителя. Остаток в колбе подкисляли раствором HCl с концентрацией не менее 1 моль/л до pH не менее 4 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором NaHCO_3 и NaCl , сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Полученный бесцветный аморфный остаток растворяли

45 в минимальном количестве дихлорметана и прикапывали при перемешивании гексан, до прекращения выпадения осадка. Выпавший осадок отфильтровывали и ресуспендировали в гексане в УЗИ-бане, затем заново отфильтровывали. Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать

диизопропилэтиламин или триэтиламин.

На третьем этапе повторно осуществляли процесс активации карбоксильной группы соединения Boc-L-Phe-L-Tyr с последующим взаимодействием с азидопропиламином (не менее 1 экв) в течение не менее 24 часов при комнатной температуре в дихлорметане.

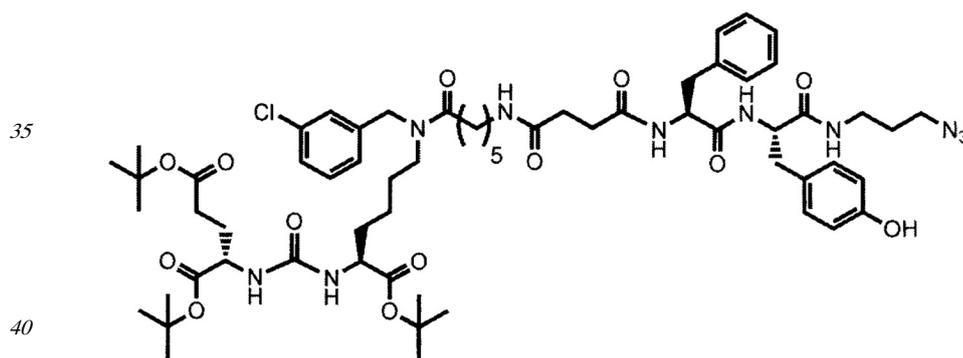
По окончании сырую реакционную массу хроматографировали на колонке с силикагелем, в результате получали промежуточный дипептидный амид, который вовлекается в реакцию удаления трет-бутоксикарбонильной защиты действием 10 об. % раствора трифторуксусной кислоты в безводном дихлорметане.

Добавление TFA производили при охлаждении на водяной бане со льдом при температуре не более 10°C с последующим постепенным нагревом реакционной смеси до комнатной температуры. Снятие защиты при комнатной температуре проводить не менее 3 часов.

Таким образом, в результате последовательности реакций по схеме превращения был осуществлен синтез производного дипептида L-фенилаланил-L-тирозина (L-Phe-L-Tyr) (VI), который использован в последующем для получения высокоспецифичных ПСМА-векторов. Разработанные методы синтеза отличаются экологичностью, хорошими выходами целевых продуктов, высокой селективностью процессов и не требуют применения специальной аппаратуры или дорогостоящих реагентов. Получение тритретбутил производного соединения радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, включающего фрагменты 6-аминогексановой кислоты, фрагмент фенилаланина и фрагмент тирозина общей формулы (VII), осуществляли реакцией образования амидной связи продукта ацилирования янтарным ангидридом и производным дипептида формулы (VI) (Фиг. 12).

К раствору продукта ацилирования янтарным ангидридом в ДМФА добавляли не менее 1 эквивалента дипептида, НОВТ, НВТУ и ненуклеофильного основания. Смесь перемешивали не менее 24 ч. Далее удаляли растворитель при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью метода колоночной хроматографии. Элюент - EtOAc\MeOH = 5:1.

Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать диизопропилэтиламин или триэтиламин.

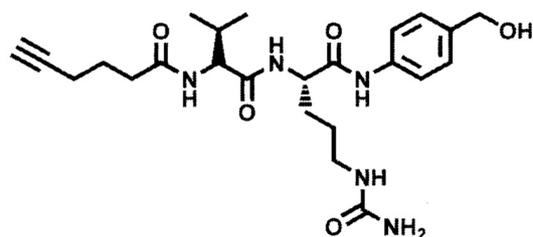


(VII)

Получение соединения радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, общей формулы (II) осуществляли путем удаления тритретбутильных защитных групп соединения формулы (VII). Удаление тритретбутильных защитных групп проводили в присутствии 9-11 об. % ТФУ в течение 15-17 часов в дихлорметане (Фиг. 12).

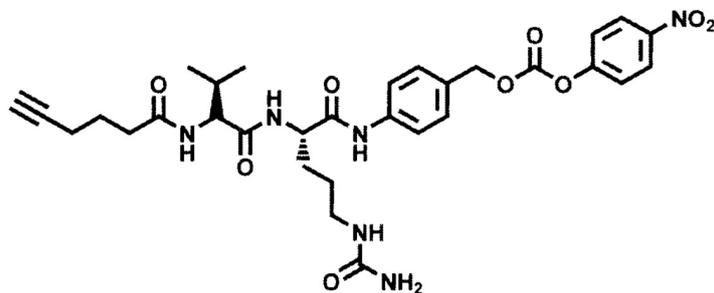
Получение модифицированного производного Val-Cit-PAВ-ОН проводили с помощью

реакции ацилирования 5-гексиновой кислотой. К раствору модифицированного дипептида в ДМФА добавляли не менее 1 эквивалента 5-гексиновой кислоты, НВТУ и ненуклеофильного основания. Смесь перемешивали не менее 24 ч. Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Особенностью выделения индивидуального целевого соединения заключается в осаждении образовавшейся реакционной смеси с использованием этилацетата и с применением ультразвуковой бани, и последующей фильтрации. В результате было получено индивидуальное соединение 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-ОН (VIII) (Фиг. 13).



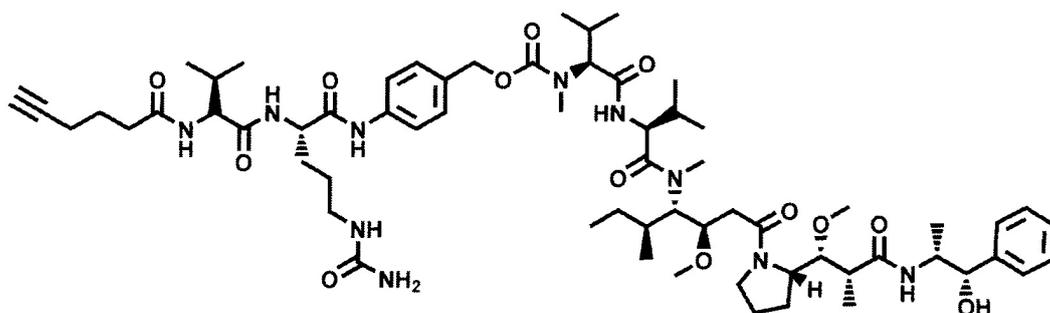
(VIII)

Дальнейшую модификацию 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-ОН проводили с помощью реакции образования смешанного карбоната. К раствору 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-ОН в ДМФА добавляли не менее 3 эквивалентов бис(4-паранитрофенил) карбоната, а также ненуклеофильного основания. Смесь перемешивали не менее 5 ч. Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Особенностью выделения индивидуального целевого соединения заключается в осаждении образовавшейся реакционной смеси с использованием этилацетата и с применением ультразвуковой бани, и последующей фильтрации. В результате было получено индивидуальное соединение 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-PNP (IX) (Фиг. 13).



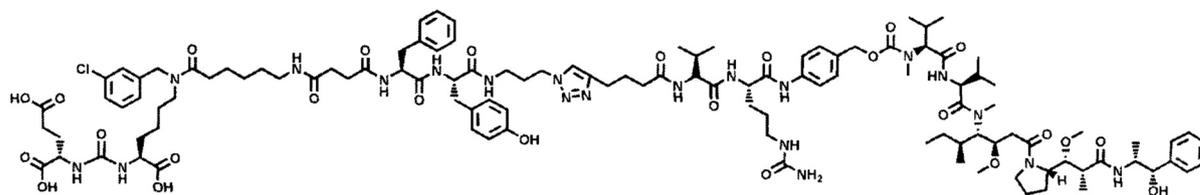
(IX)

Дальнейшую модификацию 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-PNP проводили с помощью реакции образования карбамата с монометил ауристатином Е. К раствору 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-PNP в ДМФА добавляли не менее 1 эквивалентов ММАЕ, ненуклеофильного основания, а также каталитические количества НОВт. Смесь перемешивали не менее 16 ч. Далее реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Дальнейшую очистку соединения осуществляли осаждением образовавшейся реакционной смеси с использованием этилацетата и с применением ультразвуковой бани, и последующей фильтрации. Индивидуальное соединение 5-гексинамидо-Val-Cit-РАВ-ММАЕ (X) выделяли с помощью препаративной обращенно-фазовой хроматографии (Фиг. 13).



(X)

Получение конъюгата формулы (I) осуществляют реакцией азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемой ионами меди (I), получаемой *in situ*. Реакция проводится с использованием 0,1-1 мольных эквивалентов пентагидрата сульфата меди (относительно лиганда II) и 0,3-3 мольных эквивалентов аскорбата натрия в смеси DMF/H₂O (концентрация 4:1) с содержанием воды 10-50 об. %, а также 0,9-1,1 мольных эквивалентов производного 5-гексинамидо-Val-Cit-PAВ-MMAE (X), содержащего терминальную алкиновую группу (Фиг. 14).



(I),

Конъюгат (I) можно применять отдельно или в комбинации с другими соединениями, подходящими для диагностики, визуализации и/или лечения заболеваний, вызванных клетками, экспрессирующими ПСМА.

Соединения по настоящему изобретению можно использовать для терапии практически всех солидных опухолей, экспрессирующих PSMA, включая опухоль легкого, почечно-клеточную, глиобластому, поджелудочной железы, мочевого пузыря, саркому, меланому, молочной железы, толстой кишки, зародышевых клеток, феохромоцитому, пищевода и желудка. Также, в соответствии с настоящим изобретением, можно визуализировать некоторые доброкачественные поражения и ткани, включая эндометрии и хроническую пептическую язву пищевода (синдром Баррета).

ПСМА (PSMA) часто экспрессируется в эндотелиальных клетках капиллярных сосудов в околоопухолевой и внутриопухолевой областях различных злокачественных опухолей, таким образом, соединения по настоящему изобретению и способы терапии с использованием таких соединений являются подходящими для лечения таких злокачественных опухолей.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксическому материалу, который не взаимодействует с действием активного компонента фармацевтической композиции. «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к биосовместимому раствору, который в достаточной степени имеет такие характеристики, как стерильность, р[Ета], изотоничность, стабильность и подобные, и может включать любые растворители, разбавители, включая стерильный физиологический раствор, раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор декстрозы для инъекций, раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций, содержащий лактат раствор Рингера для

инъекций и другие водные буферные растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и подобные. Фармацевтически приемлемый носитель также может содержать стабилизаторы, консерванты, антиоксиданты или другие добавки, которые хорошо известны

5 специалистам в данной области, или другой наполнитель, известный из уровня техники.

"Фармацевтически приемлемые соли" относятся к производным раскрываемых соединений, где исходное соединение модифицируют так, чтобы получить нетоксичные кислотные или основные соли такого соединения. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое

10 содержит трикислотные группы, традиционными химическими способами. Как правило, такие соли можно получить путем взаимодействия формы свободной кислоты этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат Na, Ca, Mg или K или подобные) или путем

15 взаимодействия формы свободного основания этих соединений со стехиометрическим количеством подходящей кислоты. Такие реакции типично осуществляют в воде или в органическом растворителе, или в смеси двух вышеуказанных растворителей. Как правило, используют неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, где это практически возможно. Перечень дополнительных

20 подходящих солей можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p.1418 (1985).

Пример получения натриевой соли Конъюгата (I) с использованием гидроксида натрия приведен на Фиг. 15

Ниже представлено более подробное описание заявляемого изобретения. Настоящее изобретение может подвергаться различным изменениям и модификациям, понятным

25 специалисту на основе прочтения данного описания. Такие изменения не ограничивают объем притязаний. Пример 1.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-25-бензил-33-(4-(4-(((R)-1-(((S)-1-((4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-

30 диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-4-оксобутил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновая кислота (Конъюгат (I)) (Фиг. 14)

35 Соединение (II) (75 мг., 0.71 ммоль) растворили в смеси 3:1 ДМФА и воды (12 мл). Колбу заполнили аргоном. Далее добавили модифицированный ММАЕ (X) (83 мг, 0.068 ммоль), аскорбат натрия (16 мг, 0.082 ммоль) и пентагидрат сульфата меди (7 мг, 0,027 ммоль). Смесь перемешивали 24 часа. Далее добавили этилендиаминтетрауксусную кислоту (16 мг, 0,054 ммоль) и реакционную смесь перемешивали еще 1 час. Далее

40 упарили растворитель. Дальнейшую очистку проводили с помощью метода обращенной фазовой хроматографии: Puriflash 15C18HP-F0012, система вода/ацетонитрил, от 5% ацетонитрила до 100% ацетонитрила в течение 25 минут, далее 5 минут промывали метанолом, скорость потока - 20 мл/мин.

Конъюгат (I) был выделен в виде белого аморфного порошка, выход составил 120

45 мг (78%).

Спектр ЯМР ¹H Конъюгата (I) (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.) представлен на фиг. 1. 9.97 (м, 3H), 8.28 (м, 3H), 8.12 (м, 2H), 8.03 (м, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.77-7.85 (м, 3H), 7.55-7.60 (м, 4H), 7.20-7.28 (м, 6H), 7.12-7.17 (м, 6H), 6.98 (м, 2H), 6.58-6.64 (м, 3H), 5.97 (м,

3H), 5.32-5.43 (м, 4H), 4.91-5.05 (м, 4H), 4.59-4.70 (м, 3H), 4.33-4.44 (м, 4H), 4.25-4.23 (м, 1H), 4.20 (м, 3H), 3.88-4.02 (м, 4H) 3.73-3.75 (м, 2H), 3.50-3.55 (м, 2H), 3.14-3.21 (м, 6H), 3.08 (м, 2H), 2.94-3.03 (м, 7H), 2.84-2.86 (м, 2H), 2.76-2.81 (м, 4H), 2.63-2.68 (м, 1H), 2.49-2.55 (м, 2H), 2.35-2.39(м, 2H), 2.20-2.30 (м, 4H), 1.99-2.11 (м, 5H), 1.67-1.96 (м, 11H), 1.06-1.55 (м, 17H), 0.90-1.02 (м, 5H), 0.71-0.85 (м, 16H) (Рисунок 3.30).

ВЭЖХ - хроматограмма соединения Конъюгат (I) (фиг. 2)

ESI HRMS соединения Конъюгат (I) (фиг.3)

m/z рассчитано для $C_{114}H_{165}ClN_{20}O_{26} [M+2H]^{2+}$ 1134.1036, найдено: 1134.1046

ИК спектр соединения Конъюгат (I): 3308.28 (NH), 2965.02 (Ar), 2937.05 (Ar), 2875.34 (Ar), 1675.84 (C(O)NH), 1649.80 (C(O)NH), 1540.84 (C(O)NH), 1516.74 (C(O)NH), (фиг. 4).

Пример 2.

Оценка эффективности противоопухолевого Конъюгата (I) на ксенографтной модели рака предстательной железы

Для изучения эффективности препарата была выбрана ксенографтная модель, как достаточно показательная для доклинических исследований (Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells Takeshi Namekawa, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue Cells. 2019 Jan; 8(1). Критериями противоопухолевой активности служило торможение роста опухоли (ТРО) (Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США // Ред. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Goldin F., Klein I. // М.: Медицина, 1980) у леченных животных ($P_{оп}$) по сравнению с контрольными ($P_{к}$), выраженное в процентах:

$$ТРО = \frac{P_{к} - P_{оп}}{P} , \%$$

Лечение во всех группах начинали при появлении опухолевых узлов.

Группа (КРО)

В группе без специфического лечения на 1 сутки после окончания лечения $V_{ср} = 165 \pm 83 \text{ мм}^3$, на 8-е - $V_{ср} = 1121 \pm 475$. Прирост опухоли на момент окончания исследования составил $V_8/V_1 = 6,8$ раза.

Группа Конъюгат (I) 0,3 мг/кг

При применении конъюгата в разовой дозе 0,3 мг/кг на 1-е сутки после окончания введения эффект достиг значимого достоверного критерия $ТРО = 83\%$ ($p < 0,001$) и сохранялся на весь срок эксперимента: на 4-е сутки $ТРО = 85\%$ ($p < 0,001$) и на 8-е сутки после окончания лечения достиг значения $ТРО = 70\%$ ($p < 0,001$) (Фиг. 5, таблица 1). Гибели не наблюдали. Прирост опухоли на момент окончания исследования составил $V_8/V_1 = 2,6$ раза (Таблица 1).

Оценка переносимости

Общее состояние и поведение мышей на фоне и после применения агента в дозе 0,3 мг/кг было удовлетворительным без патологических изменений и отсутствия гастроэнтостинальной и какой-либо другой токсичности, 100% выживаемость (Таблица 2).

Исследование in vivo показало наличие достоверного противоопухолевого эффекта для препарата в разовой дозе 0,3 мг/кг: Конъюгат (I): $ТРО = 85-70\%$, $p < 0,05$. Исследование in vivo показало, что мыши в группе Конъюгат (I) 0,3 мг/кг хорошо перенесли и гибели на протяжении всего эксперимента не наблюдали - 100% выживаемость.

Пример 3

Оценка противоопухолевой активности Конъюгат (I) на модели лимфолейкоза P388 и Меланомы В16

Опыт №1

Лимфолейкоз P388 (мыши-самцы BDF₁) - наблюдение 30 суток после первого введения препарата (введение препарата начинали через 24 часа после перевивки) и вводили 3-х-кратно внутрибрюшинно через день.

Исследуемые дозы:

1. Группа 1 - контроль роста опухоли (КРО)
 2. Группа 2 - плацебо (растворитель)
 3. Группа 3 - внутрибрюшинное введение Конъюгата (I) в дозе 0,5 мг/кг 3-кратно;
 4. Группа 4 - внутрибрюшинное введение Конъюгата (I) в дозе 1,0 мг/кг 3-кратно;
- Экспериментальным животным в контрольной группе (КРО) вводили 0,9% физиологический раствор, в группе плацебо вводили растворитель (ДМСО+Гемодез) в аналогичном объеме. О противоопухолевой активности судили по продолжительности жизни мышей.

На модели лимфолейкоза P388 результаты показали наличие противоопухолевого эффекта в дозе Конъюгат (I) 0,5 и 1 мг/кг. Выживаемость к 30 суткам опыта 100% (Фиг. 6, Таблица 4).

Опыт №2

Меланома В16 - 30 суток после первого введения препарата (введение препарата начинали через 48 часов после перевивки) и вводили 3-х-кратно внутрибрюшинно через 5 дней.

Исследуемые дозы:

1. Группа 1 - растворитель (плацебо)
 2. Группа 2 - внутрибрюшинное введение Конъюгата (I) в дозе 1 мг/кг 3-кратно;
- Экспериментальным животным в контрольной группе вводили растворитель (ДМСО+Гемодез) в аналогичном объеме (препарат плацебо). Измерение опухолевого узла проводили трехкратно (на 1, 4 и 8 сутки после окончания лечения). О противоопухолевой активности судили по стандартным показателям: торможение роста опухоли ТРО (>50%). Наблюдение за выживаемостью продолжали до 30 суток (Таблица 3).

На модели меланомы В16 показано наличие достоверного противоопухолевого эффекта при дозе 1,0 мг/кг: ТРО max = 75, 62 и 61% (Таблица 4).

Пример 4

Изучение фармакокинетики препарата Конъюгат (I) в плазме крови кроликов и крыс после однократного введения

Зайцеобразные и грызуны являются стандартными объектами для доклинических исследований потенциальных лекарственных средств, в том числе для определения фармакокинетических параметров. Кролики и крысы рекомендуются нормативными документами в качестве тест-систем для исследования фармакокинетических свойств фармацевтических препаратов (фиг. 7, фиг. 8).

Кролики.

Данное исследование проведено на здоровых бодрствующих кроликах-самцах породы «Советская шиншилла» возрастом 2,5-3 месяца и массой тела в диапазоне 2,0 - 2,5 кг. В эксперимент включено по 7 кроликов на каждый из препаратов, общее количество животных - 21. Фармакокинетические данные, полученные от такого количества испытуемых животных, представляются достаточными для получения первичных количественных характеристик распределения и элиминации исследуемого препарата и расчета параметров дескриптивной статистики.

Крысы.

Данное исследование проведено на здоровых бодрствующих белых аутбредных взрослых крысах-самцах возрастом около 3 месяцев с массой 190-210 г. В эксперимент включено по 7 крыс для каждого препарата, всего 21 животное. Фармакокинетические данные, полученные от такого количества испытуемых животных, представляются достаточными для получения первичных количественных характеристик распределения и элиминации исследуемого препарата и расчета параметров дескриптивной статистики.

Исследуемый препарат Конъюгат (I)

Состав:

1. Конъюгат (I)

2. Солюбилизатор Плуороник F127 - в количестве, пятикратно превышающем количество конъюгата по массе.

3. Растворитель - инфузионный раствор Гемодез.

Диметилсульфоксид - в количестве 5% от приготавливаемого объема. Эксперимент на кроликах (см. таблицы 5,6). Исследование на крысах (см. таблицы 7,8)

Пример 5

Исследование острой токсичности препарата Конъюгат (I) на мышях и крысах

Состав:

1. Конъюгат (I).

2. Солюбилизатор Плуороник F127 - в количестве, пятикратно превышающем количество конъюгата по массе.

3. Растворитель - инфузионный раствор Гемодез.

4. Диметилсульфоксид - в количестве 5% от приготавливаемого объема.

Вид, линия, количество животных

В эксперименте использованы белые аутбредные мыши-самцы возрастом около 2 месяцев с массой 19-21 г., а также белые аутбредные взрослые крысы-самцы возрастом около 2 месяцев с массой 190-210 г.

Исследование острой токсичности проводилось при внутривенном введении. Перед началом эксперимента по определению острой токсичности животные были лишены корма и воды, (мыши на 2 часа, крысы на 10-12 часов), после чего взвешены. Затем каждому животному вводили внутривенно препарат согласно дизайну исследования, в объеме не превышающем допустимый разовый объем введения: для мышей - 0,5 мл, для крыс - 2 мл, при необходимости - дробно. В контрольной группе животным вводили раствор Плуороника в Гемодезе в соотношении, использованном при приготовлении дозы 78 мг/кг для мышей и 38 мг/кг для крыс. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 14 дней. В этот период были оценены видимые признаки интоксикации (см. таблицу 9).

Зависимость летальности от дозы препарата для мышей-самцов представлена в Таблице 10.

В Таблице 11 показана динамика массы тела мышей-самцов для выживших животных в группах 3 и 5 мг/кг, а также в контрольной группе. Для доз более 5 оценка динамики массы тела не целесообразна, ввиду малого числа выживших животных. Для всех изученных доз наблюдается снижение скорости прироста или снижение массы тела относительно исходной.

В результате исследования острой токсичности установлена среднесмертельная доза для мышей (6,3 мг/кг) и максимальная переносимая доза для мышей (3 мг/кг).

Токсический эффект у мышей сопровождается поражением почек, снижением двигательной активности, дозозависимым парезом задних конечностей. На больших

дозах кровоизлияния в ЖКТ, на максимальных - снижение двигательной активности, переходящее в адинамию, однако морфологические изменения в органах не сформированы (Таблица 12).

5 Зависимость летальности от дозы препарата для крыс-самцов представлена в Таблице 13.

В таблице 14, показана динамика массы тела крыс-самцов для выживших животных в группах 3 и 4 мг/кг, а также в контрольной группе. Для доз более 5 мг/кг оценка динамики массы тела не целесообразна, ввиду малого числа выживших животных. Для всех изученных доз наблюдается снижение скорости прироста или снижение массы тела 10 относительно исходной.

В результате исследования острой токсичности установлена среднесмертельная доза для крыс (4,9 мг/кг) и максимальная переносимая доза для крыс (4 мг/кг).

Токсический эффект у мышей сопровождается поражением почек, снижением двигательной активности, дозозависимым парезом задних конечностей. На больших 15 дозах кровоизлияния в ЖКТ, на максимальных - снижение двигательной активности, переходящее в адинамию, однако морфологические изменения в органах не сформированы.

Токсический эффект у крыс сопровождается таким ведущим симптомом как диарея и поражение почек. У части животных гипертрофирована селезенка. На больших дозах 20 выраженное снижение двигательной активности, поражение печени, выделение порфирина со слизистых оболочек глаз и носа.

Пример 6

Исследование хронической токсичности препарата Конъюгат (I) на крысах и кроликах
Состав:

- 25 1. Конъюгат (I).
2. Солюбилизатор Плюроник F127 - в количестве, пятикратно превышающем количество конъюгата по массе.
3. Растворитель - инфузионный раствор Гемодез.
4. Диметилсульфоксид - в количестве 5% от приготавливаемого объема.

30 Вид, линия, количество, возраст животных

В эксперимент было взято 100 белых аутбредных взрослых крыс-самцов возрастом около 2 месяцев с массой 190-210 г и 60 половозрелых кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» возрастом около 2 месяцев с массой 2-2,2 кг. Предполагаемый 35 дизайн исследования хронической токсичности Конъюгата (I) представлен в Таблице 2. В эксперименте по определению хронической токсичности дизайном исследования было определено внутривенное введение исследуемых препаратов один раз в 3 недели на протяжении 3 месяцев (всего 4 введения). Местно-раздражающее действие препаратов при внутривенном введении будет изучено совместно с исследованием хронической токсичности.

40 Каждому животному вводили внутривенно раствор исследуемого или препарата сравнения в объеме, не превышающем допустимый объем однократного введения 2 мл для крыс и 20 мл для кроликов. В контрольной группе животных препараты были заменены на раствор Плюроника с ДМСО в Гемодезе. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 4 недели (промежуточный этап). Ежедневно 45 оценивали оценены видимые признаки интоксикации. В течение исследования зарегистрированы интегральные показатели здоровья животных (см. таблицы 15, 16, 17).

В результате исследования хронической токсичности препарата Конъюгат (I) установлено, что данный препарат продемонстрировал умеренную токсичность,

приблизительно одинаковую для обоих видов животных. Признаки интоксикации регистрировались только в группах, получавших дозу эквивалентную 1,5 от ожидаемой эффективной. Основным наблюдаемым токсический эффект - снижение скорости набора массы тела у обоих видов животных.

5 Анализ результатов тестирования выделительной системы крыс демонстрирует влияние на нее препарата: достоверно снижен объем мочи, наблюдаются изменения кислотности.

Свободный терапевтический агент ММАЕ продемонстрировал высокую токсичность - до второго введения дожило только одно животное из крыс и ни одного кролика.

10 Пример 7. Готовая лекарственная форма препарата Конъюгат (I) для практического использования изобретения

Готовая лекарственная форма, предназначенная для практического применения изобретения, и представляет собой лиофилизированный фармацевтический препарат, который включает в себя Конъюгат (I) в соответствии с изобретением, а также может
15 включать растворители, наполнители, буфер, и другие приемлемые для стерильных лекарственных форм компоненты.

Препарат позволяет получать препарат в виде раствора для инъекций и/или инфузий конъюгата в соответствии с изобретением, который соответствует по своей концентрации клиническим потребностям.

20 При разработке лекарственной формы при помощи программ ACDLabs, Molinspiration, ChemAxon, ALOGPS 2.2 были изучены структурные свойства молекулы, проведен анализ показатели LogS, LogP, pKa (Таблица 18).

Как видно из представленных данных, субстанция по своим свойствам является молекулой с множеством пептидных связей. Данные для оценки растворимости,
25 следующие: $\text{LogP} = 5,28 \pm 2,3$ и $\text{LogS} = -5,55$, что эквивалентно растворению 6,33 мг/л в чистой воде. Другой показатель, который мы имеем это значения поляризация поверхности молекулы (PSA\TPSA). Молекула достаточно полярная на что указывает значение PSA\TPSA.

30 Растворители, которые используются при получении инъекционных лекарственных форм могут включать в себя спирт этиловый спирт, метиловый спирт, изопропиловый спирт, трет-бутанол, воду, диметилсульфоксид, буферные растворы, жирные масла, смеси растительных масел с этилолеатом, бензилбензоатом, водно-глицериновые, этанола-водно-глицериновые.

35 Более предпочтительно, поскольку молекула имеет много полярных групп и в тоже время является пептидом, трет-бутанол и его водные смеси, изопропиловый спирт и его водные смеси.

Используемый в препарате наполнитель может представлять собой моно-, ди- или трисахарид. Примерами моносахаридов, которые могут быть упомянуты, являются глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза и сорбоза, примерами дисахаридов, которые
40 могут быть упомянуты, являются сахароза, лактоза, мальтоза и трегалоза, а примером трисахарида, который может быть упомянут, является раффиноза. Так же указанный наполнитель может представлять собой сорбитол, а также любое другое вещество с подходящей температурой стеклования.

Используемый в препарате наполнитель может представлять собой водорастворимые
45 полимеры, подходящие для использования в составе фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь следующими веществами: как поливинилпирролидон (PVP), высокомолекулярные полиалкилен-оксиды, такие как полиэтиленоксид и полипропиленоксид и сополимеры этиленоксида и

пропиленоксида, поливиниловый спирт. Наполнитель присутствует в препарате в концентрации приблизительно от 50 до 99%.

Если препарат включает буферные растворы, то они должны быть физиологически переносимыми веществами, которые приемлемы для установления желательного значения рН. Количество буферных веществ выбирают таким образом, чтобы после восстановления лиофилизированного препарата, например, с помощью воды для инъекций полученный водный раствор имел буферную концентрацию от 5 ммол/л до 20 ммол/л, предпочтительно приблизительно 10 ммол/л. Предпочтительными буферными растворами являются цитратный буферный раствор или фосфатный буферный раствор. Приемлемые фосфатные буферные растворы представляют собой растворы солей фосфорной кислоты моно- и/или динатрия и калия, таких, как гидрофосфат динатрия или дигидрофосфат калия, а также смеси солей натрия и калия, такие как, например, смеси гидрофосфата динатрия и дигидрофосфата калия.

Если восстановленный раствор не является уже изотоническим, вследствие осмотических свойств конъюгата, то вспомогательные вещества, которые необходимы для установления и стабилизации изотонических свойств раствора, могут быть такие как: предпочтительно физиологически переносимая соль, например, хлорид натрия или хлорид калия, или физиологически переносимый полиол, например, глюкоза или глицерин.

Кроме того, препарат может включать также физиологически переносимые вспомогательные вещества, такие как, например, антиоксиданты, такие, как аскорбиновая кислота или глутатион, консерванты, такие, как фенол, крезол, метил- или пропилпарабен, хлорбутанол, тиомерсал или хлорид бензалкония, полиэтиленгликоли (PEG), такие, как PEG 3000, 3350, 4000 или 6000, или циклодекстрины, такие, как гидроксипропил- β -циклодекстрин, сульфобутилэтил- β -циклодекстрин или γ -циклодекстрин, хилаторы, такие как динатрия эдетат.

Препарат в соответствии с изобретением может включать в себя растворитель для лиофилизата. Растворитель исходя из характеристик активного компонента и лиофилизата может содержать этиловый спирт, этиловый спирт с поверхностно-активными веществами такие как полисорбаты, полиэтиленгликоль, сложный эфир полиоксиэтиленгликоля и производные полиоксиэтилена касторового масла в различных соотношениях.

Предпочтительно, в качестве растворителя может использоваться этиловый спирт 95% с полисорбат 80 в массовом соотношении 30 - 60 к от 70 до 40. Данные соотношения были подтверждены экспериментально. Результаты визуального контроля и спектрофотометрические исследования образцов на длине волны 390 нм показали, что при соотношениях, выходящих за данные рамки препарат в виде лиофилизата, не растворим.

Более предпочтительно, в качестве растворителя может использоваться этиловый спирт 95% с полисорбат 80 в массовом соотношении 43 к 57.

Препарат в соответствии с изобретением может быть приготовлен путем получения водного препарата, включающего Конъюгат (I) в качестве активного ингредиента, а также наполнитель и, если это является желательным, фармацевтические вспомогательные вещества такие как буферные соли и консерванты, с последующей лиофилизацией раствора и восстановлением лиофилизата в растворителе.

Готовая лекарственная форма имеет в составе, но не ограничивается следующими примерами

(см. таблицы 19-24).

Для приготовления готовой лекарственной формы используют следующие этапы:

Получение лиофилизата

Вспомогательные вещества и Конъюгат (I) передают в изолятор с интегрированной системой для приготовления растворов и лиофилизатов. Взвешивают следующие

5 количества сырья:

1) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 750 мл 2-метил-2-пропанола и 250 мл цитратного

10 буферного раствора pH 4.5; отвешивают 5,5 г Конъюгат (I) и 22,0 г поливинилпирролидона. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь 2-метил-2-пропанола и цитратного буфера pH 4.5. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для

15 розлива.

2) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 750 мл 2-метил-2-пропанола и 250 мл воды очищенной. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят

20

в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь 2-метил-2-пропанола и воду очищенную. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для розлива.

25

3) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 800 мл изопропанола (спирт изопропиловый) и 200 мл цитратного буферного раствора pH 4.5; отвешивают 5,5 г Конъюгата (I) и 22,0 г поливинилпирролидона. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят

30

в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь изопропанола и воды очищенной. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для розлива.

40

4) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 800 мл изопропанола (спирт изопропиловый) и 200 мл

35

воды очищенной; отвешивают 5,5 г Конъюгата (I) и 22,0 г поливинилпирролидона. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят

45

в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь изопропанола и воды очищенной. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для розлива.

45

5) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 500 мл изопропанола (спирт изопропиловый) и 500 мл цитратного буферного раствора pH 4.5; отвешивают 5,5 г Конъюгата (I) и 22,0 г поливинилпирролидона. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят

45

в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь изопропанола и цитратного буфера pH 4.5. Перемешивают при

помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для розлива.

- 5 б) В емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 500 мл изопропанола (спирт изопропиловый) и 500 мл воды очищенной; отвешивают 5,5 г Конъюгата (I) и 22,0 г поливинилпирролидона. Отвешенные количества Конъюгата (I) и поливинилпирролидона поочередно вносят в емкость для приготовления раствора, содержащую смесь изопропанола и воды
- 10 очищенной. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до полного растворения компонентов и получения прозрачного однородного раствора. Полученный раствор из емкости фильтруют через систему мембранной фильтрации в промежуточную емкость для розлива.

15 Далее производят розлив во флаконы в стерильных условиях, где флаконы заполняют раствором по 1,0 мл в каждый флакон. Флаконы преукупоривают резиновой пробкой. Подготовленные таким образом флаконы устанавливают в лиофильную сушку.

Далее производят лиофильную сушку препарата. Запускается режим заморозки до температуры - 50°C на 7 часов. По окончании режима заморозки сушилка автоматически переходит в режим основной сушки, при которой в камере создается давление 0,8 мбар,

20 а температура полки повышается до - 40°C, в таком режиме продукт сушится 40 часов. По окончании основной сушки, включается конечная сушка, давление постепенно доходит до 0,11 мбар, а полка постепенно прогревается до 25°C. Длительность конечной сушки составляет до 5 часов. По окончании всего цикла сушки флаконы доукупоривают и надевают алюминиевые колпачки.

- 25 Получение растворителя

Для восстановления лиофилизата подготавливают растворитель. Для этого в емкость для приготовления раствора на 2000 мл, промаркированную этикеткой идентификационной, загружают 473,0 г спирта этилового, 95% и 627,0 г полисорбата 80. Перемешивают при помощи перемешивающего устройства до получения

30 гомогенного прозрачного раствора. Далее производят розлив во флаконы в стерильных условиях, где флаконы заполняют раствором по 1,0 мл в каждый флакон. Флаконы укупоривают резиновой пробкой и надевают алюминиевые колпачки.

Получение готовой лекарственной формы в виде раствора для инфузий или инъекций

35 Для приготовления раствора для инфузий или инъекций восстановленный в растворителе лиофилизат (концентрат) разводят как минимум в 10 раз в физиологическом растворе, например в 0,9% NaCl для получения прозрачного раствора.

Соотношения растворителей этанол : полисорбат 80 были подобраны в ходе экспериментальных работ. Различные соотношения растворителей в объеме 1 мл были добавлены к лиофилизату и перемешаны в течение 5 минут (общее время не превышает

40 10 мин). Далее, для приготовления раствора для инфузий или инъекций восстановленный в растворителе лиофилизат разводили в 10 раз в 0,9% NaCl. Полученные растворы оценивались визуальнo и спектрофотометрически на длине волны 390 нм. Измерения проводились до и после фильтрации через фильтр 0.22 мкм. Результаты измерений представлены в таблице 25. Результаты измерений показали, что составы 1-5 приводят

45 к получению прозрачного раствора до и после фильтрации что свидетельствует о получении растворенного препарата, тогда как составы 6 и 7 образуют мутные растворы (крупные мицеллы), которые сорбируются на фильтре в процессе фильтрации.

Стабильность лиофилизата содержащего Конъюгат (I) была изучена в режиме

ускоренного хранения при 25°C (эквивалентного 1 году) и в режиме 1 года естественного хранения при температуре хранения минус (20±2)°C. Результаты анализов показали, что лиофилизат стабилен по всем исследованным показателям качества в течение исследуемого срока хранения. Данные по стабильности приведены в таблице 26 и 27.

5

Таблица 1 - Ингибирование роста п/к ксенографтов рака предстательной железы 22Rv1 под действием конъюгата (I) при внутривнутрибрюшинном 3-кратном введении через 5 дней

10

15

20

25

№ опухоли/ показатели	Объем опухоли (мм ³) и показатели эффективности до начала лечения (0) и на сутки после окончания введения веществ (1-8)							
	0		1		4		8	
	КРО	Конъюгат (I), 0,3 мг/кг	КРО	Конъюгат (I), 0,3 мг/кг	КРО	Конъюгат (I), 0,3 мг/кг	КРО	Конъюгат (I), 0,3 мг/кг
1.	Опухоли появились, измерению не подлежат (~10-20 мм ³)		176	18	411	72	686	94
2.			250	40	555	81	896	96
3.			102	22	391	72	805	346
4.			130	17	471	42	872	111
5.			69	45	322	75	504	369
6.			135	14	382	38	682	186
7.			207	19	703	78	1136	463
8.			322	30	867	173	2175	597
9.			79	32	283	63	1059	570
10.			111	31	406	108	982	314
11.			321	51	947	115	1911	853
12.			126	30	514	65	1148	177
13.			180	17	717	74	1511	247
14.			95	34	661	102	1325	349
Вср.	-	165	28	545	83	1121	341	
Станд откл.	-	83	11	205	34	475	220	
ТРО%	-	-	83	-	85	-	70	

Тест	-	0,000002	0,0000001	0,00001
------	---	----------	-----------	---------

Таблица 2 - Масса тела мышей на различные сроки от начала лечения, среднее и его ошибка (M±m)

30

Группа	Сутки от начала лечения				
	0	2	4	6	8
Контроль	23,9±0,47	23,2±0,27	24,8±0,16	25,2±0,17	25,7±0,21
Конъюгат (I) (0,3 мг/кг)	22,2±0,53	21,2±0,36	18,0±0,48	19,2±0,35	19,4±0,4

35

Таблица 3 - Модель лимфолейкоза 388 - Масса мышей на различные сроки от начала лечения

40

Группа	Сутки от начала лечения		
	0	2	4
Контроль	22,3±0,68	22,2±0,5	23,7±0,62
Контроль (растворитель)	19,1±0,48	18,1±0,54	20,2±0,5
Конъюгат (I) (0,5 мг/кг)	19,9±0,36	19,2±0,28	19,2±0,32
Конъюгат (I) (1,0 мг/кг)	19,7±0,36	19,7±0,48	19,7±0,42

45

Таблица 4 – Ингибирование роста п/к меланомы В16 под действием конъюгата (I) при внутрибрюшинном 3-кратном через 5 дней курса

№ опухоли, показатели	Объем опухоли (мм ³) и показатели эффективности на сутки после окончания лечения					
	1		4		8	
	КРО	Конъюгат (I) 1,0 мг/кг	КРО	Конъюгат (I) 1,0 мг/кг	КРО	Конъюгат (I) 1,0 мг/кг
1	48	64	595	448	1470	855
2	125	135	1386	768	3640	1080
3	56	72	504	364	1134	855
4	72	64	1020	476	2912	1045
5	1020	48	2160	220	пала	675
6	134	90	915	544	1846	1144
7	365	36	967	525	2256	972
8	290	16	1520	120	2785	560
Средние значения	264	66	1133	433	2292	898
Станд. откл.	194	14	331	81	626	73
ТРО%	-	75	-	62	-	61

Таблица 5 - Концентрации Конъюгата (I) в плазме крови кроликов и данные описательной статистики для них

	Время после введения (час)													
	0.00	0.08	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00	
Животное	Концентрация (мкг/мл)													
1	BLQ	8.877	7.252	5.727	4.775	3.741	3.781	2.291	1.361	0.997	0.872	0.604	0.510	
2	BLQ	9.617	8.986	6.946	6.323	5.097	4.699	3.693	2.878	1.799	1.703	1.207	1.042	
3	BLQ	8.575	6.798	6.343	5.459	4.818	4.321	3.143	2.498	1.766	1.169	0.968	0.787	
4	BLQ	9.582	10.697	7.254	5.098	4.849	3.842	3.600	2.427	1.307	1.355	0.859	0.486	
5	BLQ	10.683	11.336	8.260	6.807	5.670	5.189	3.701	2.581	1.474	0.920	0.708	0.532	
6	BLQ	15.563	12.954	10.978	8.502	6.534	5.922	4.685	3.365	1.910	1.221	0.924	0.584	
N	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

5	Ср. знач.		10.483	9.671	7.585	6.161	5.118	4.626	3.519	2.518	1.542	1.207	0.878	0.657	
	Станд. отклон.		2.593	2.416	1.870	1.376	0.935	0.827	0.785	0.663	0.349	0.305	0.211	0.218	
	Минимум		8.575	6.798	5.727	4.775	3.741	3.781	2.291	1.361	0.997	0.872	0.604	0.486	
	Медиана		9.600	9.842	7.100	5.891	4.973	4.510	3.647	2.540	1.620	1.195	0.892	0.558	
	10	Максимум		15.563	12.954	10.978	8.502	6.534	5.922	4.685	3.365	1.910	1.703	1.207	1.042
		Размах		6.988	6.156	5.251	3.727	2.793	2.141	2.394	2.004	0.913	0.831	0.603	0.556
	15	КВ%		24.7	25.0	24.7	22.3	18.3	17.9	22.3	26.3	22.6	25.2	24.0	33.1
		Ср. геометр.		10.260	9.414	7.413	6.042	5.046	4.566	3.441	2.431	1.506	1.176	0.857	0.631

Таблица 6 - Полученные фармакокинетические параметры

Животное	C ₀ (мкг/мл)	AUC _{0-t} (час*мкг/мл)	AUC _{0-∞} (час*мкг/мл)	AUC _{t-∞} / AUC _{0-∞} (%)	K _{el} (1/час)	T _{1/2} (час)	V _d (мл/кг)	Cl (мл/час/кг)	MRT _{0-t} (час)
1	9.815	21.886	26.025	15.90	0.123	5.63	252.60	31.12	3.29
2	9.947	33.617	39.814	15.57	0.168	4.12	121.01	20.34	3.88
3	9.624	28.972	36.928	21.54	0.099	7.01	221.74	21.93	3.74
4	9.582	28.872	30.768	6.16	0.256	2.70	102.70	26.33	3.46
5	10.683	31.397	35.282	11.01	0.137	5.06	167.66	22.96	3.12
6	17.049	39.504	42.004	5.95	0.234	2.97	82.55	19.28	3.14
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ср. знач.	11.117	30.708	35.137	12.690	0.170	4.581	158.044	23.662	3.439
Станд. отклон.	2.933	5.840	5.906	6.129	0.063	1.646	68.153	4.392	0.317
Минимум	9.58	21.89	26.02	5.95	0.099	2.70	82.55	19.28	3.12
Медиана	9.88	30.18	36.11	13.29	0.153	4.59	144.33	22.45	3.38
Максимум	17.05	39.50	42.00	21.54	0.256	7.01	252.60	31.12	3.88
Размах	7.47	17.62	15.98	15.59	0.157	4.30	170.05	11.84	0.76
КВ%	26.4	19.0	16.8	48.3	37.2	35.9	43.1	18.6	9.2
Ср. геометр.	10.859	30.231	34.697	11.364	0.160	4.331	145.872	23.345	3.427

Таблица 7 - Концентрации Конъюгата (I) в плазме крови крыс и данные описательной статистики для них

	Время после введения (час)												
	0.00	0.08	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00	6.00	8.00	10.00	12.00
Животное	Концентрация (мкг/мл)												
1	BLQ	23.875	21.413	18.335	14.647	15.044	17.590	10.842	8.010	6.058	4.488	3.275	2.726
2	BLQ	73.356	42.222	38.542	33.473	18.741	14.951	8.544	5.728	4.247	3.212	2.180	1.705
3	BLQ	25.786	22.653	16.282	16.158	13.409	11.956	8.356	5.880	5.411	4.290	3.045	2.191
4	BLQ	13.808	11.389	12.366	8.552	7.934	7.995	6.583	5.853	4.225	2.620	1.997	1.527
5	BLQ	14.307	14.658	12.158	9.714	8.007	8.986	6.408	5.834	4.136	3.167	1.907	1.540
6	BLQ	5.351	7.119	10.304	8.934	6.334	7.297	5.360	3.851	2.938	2.335	1.809	1.262
N	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ср. знач.		26.081	19.909	17.998	15.246	11.578	11.463	7.682	5.859	4.503	3.352	2.369	1.825
Станд. отклон.		24.326	12.421	10.489	9.473	4.903	4.134	1.970	1.317	1.093	0.871	0.629	0.538
Минимум		5.351	7.119	10.304	8.552	6.334	7.297	5.360	3.851	2.938	2.335	1.809	1.262
Медиана		19.091	18.036	14.324	12.181	10.708	10.471	7.470	5.844	4.236	3.190	2.089	1.623
Максимум		73.356	42.222	38.542	33.473	18.741	17.590	10.842	8.010	6.058	4.488	3.275	2.726
Размах		68.005	35.103	28.238	24.921	12.407	10.293	5.482	4.159	3.120	2.153	1.466	1.464
КВ%		93.3	62.4	58.3	62.1	42.3	36.1	25.6	22.5	24.3	26.0	26.6	29.5
Ср. геометр.		19.046	17.024	16.162	13.435	10.724	10.869	7.479	5.732	4.389	3.259	2.304	1.765

Таблица 8 - Полученные фармакокинетические параметры

Животное	C ₀ (мкг/мл)	AUC _{0-t} (час*мкг/мл)	AUC _{0-∞} (час*мкг/мл)	AUC _{t-∞} /AUC _{0-∞}	K _{el} (1/час)	T _{1/2} (час)	V _d (мл/кг)	Cl (мл/час/кг)	MRT 0-t
1	25.202	95.993	115.670	17.01	0.139	5.00	93.61	12.97	3.91
2	96.531	110.564	121.598	9.07	0.155	4.49	79.83	12.34	2.64
3	27.501	83.377	96.420	13.53	0.168	4.13	92.61	15.56	3.88
4	15.195	57.819	69.132	16.37	0.135	5.14	160.76	21.70	4.02
5	14.307	60.334	69.475	13.16	0.168	4.11	128.16	21.59	3.98
6	5.351	45.653	54.945	16.91	0.136	5.10	201.01	27.30	4.09
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ср. знач.	30.681	75.623	87.873	14.341	0.150	4.662	125.997	18.575	3.755
Станд. отклон.	33.244	25.080	27.412	3.087	0.016	0.480	47.193	5.907	0.551
Минимум	5.35	45.65	54.94	9.07	0.135	4.11	79.83	12.34	2.64
Медиана	20.20	71.86	82.95	14.95	0.147	4.74	110.88	18.57	3.95
Максимум	96.53	110.56	121.60	17.01	0.168	5.14	201.01	27.30	4.09
Размах	91.18	64.91	66.65	7.94	0.034	1.02	121.18	14.96	1.45
КВ%	108.4	33.2	31.2	21.5	10.5	10.3	37.5	31.8	14.7
Ср. геометр.	20.663	72.138	84.261	14.023	0.149	4.641	119.183	17.802	3.715

Таблица 9 - Результаты наблюдений при однократном внутривенном введении исследуемого препарата мышам-самцам

Доза	Признаки интоксикации	Некропсия	Гибель
Контроль	У всех животных – сразу после введения одышка, проходящая через 1-2 часа после введения.	Отсутствует	0//10
2 мг/кг	Признаков интоксикации не отмечено	Отсутствует	0//10
3 мг/кг	3-4 дни – ухудшение общего состояния, начинается парез задних конечностей	Отсутствует	0//10
5 мг/кг	5 дней – у всех шерсть взъерошена, 3 мыши закрывают глаза, у одной кровотечение из ЖКТ. На 7 день – общее состояние улучшается ...	Отсутствует	0//10
5 мг/кг	3-4 дни – ухудшение общего состояния, начинается парез задних конечностей 7 день – 1 гибель	Вскрытие на 14 день: У всех светлая печень, бледные почки (рисунок на разрезе почек либо отсутствует, либо смазан)	1//10
6 мг/кг	4 день – парез задних конечностей, кахексия, кровотечение из ЖКТ (черный кал), у одной мыши адинамия, закрытые глаза. Гибель двух животных. 5 день – к вышеописанным признакам добавилась взъерошенная шерсть. 6 день – в дополнение к имевшимся признакам 2 особи сгорблены, 1 гибель. 11 день – у одной особи кровотечение из ЖКТ. На 12 день – нормализация	Отсутствует	3//10
6 мг/кг	3-4 дни – ухудшение общего состояния, начинается парез задних конечностей Гибель на 3 (1), 6 (2) дн	Отсутствует	3//10
7 мг/кг	3-4 дни – ухудшение общего состояния, начинается парез задних конечностей, снижение двигательной активности	№2 – желчь темная, копростаз № 4,7 – копростаз, парез задних конечностей	9//10
8 мг/кг	5 дней – у всех шерсть взъерошена, кровотечение из ЖКТ, парез задних конечностей. У одной особи диарея Гибель через 5,5 дней – 4 особи 6 дней - продолжают вышеописанные признаки + у одной закрыты глаза и снижение двигательной активности. 7 дн – 3 особи 11 дн – 1 особь	Отсутствует	8//10

5	9 мг/кг	После введения сразу одышка, на следующий день - одышка, шерсть взъерошена, глаза слезятся и закрываются. Со второго дня постепенно у всех развивается парез задних конечностей, общее состояние ухудшается. Гибель на 3 день (3), 4 день (5), 5 день (1), 6 день (1).	Вздутый кишечник. В желудке точечные кровоизлияния на слизистой, прямая кишка – кровоизлияния в стенке, слизистая в рубцах, мочевого пузыря переполнен, кровоизлияния в стенке	10//10
10				
15				
20	30 мг/кг	Сразу после введения наблюдалась одышка, через 3-4 минуты снижение двигательной активности, переходящее в адинамию/ распластанное положение. Гибель наблюдалась в интервале от 12 до 28 часов после введения. При этом у 6 из 10 – гибель через 12 часов. Через		10//10

		12 часов после введения у оставшихся животных – у 2 тремор, у 2 – распластанное положение.	Не отмечено никаких особенностей	
25	45 мг/кг	Сразу после введения наблюдалась одышка, через 3-4 минуты снижение двигательной активности, переходящее в адинамию/ распластанное положение. Гибель всех животных наблюдалась в течение 12 часов.	Отсутствие патоморфологических изменений может быть связано со скорой гибелью	10//10
30				
35	60 мг/кг	Сразу после введения наблюдалась одышка, через 3-4 минуты снижение двигательной активности, переходящее в адинамию/ распластанное положение. Гибель 4 через 5-7 часов, 3 – около 12 часов, 3 после 24 часов. Через 12 часов после введения у оставшихся на тот момент животных – одышка, снижение двигательной активности, распластанное положение.		10//10

Таблица 10 - Зависимость доза/эффект при внутривенном введении исследуемого препарата мышам-самцам

Зависимость доза/эффект при введении						
Исследуемый лекарственный препарат						
Доза мг/кг	3	5	6	7		
Летальность	0	1	3	10		
LD50	6,3±0,8 мг/кг					

Таблица 11 - Динамика массы тела мышей-самцов в эксперименте с однократным введением исследуемого препарата и контрольной группы животных в % от исходной массы.

5	Группа	Доза мг/кг	№ животного	5 дней	10 дней	14 день
	5	0	1	16.8	28.6	31.9
	5	0	2	15.9	30.5	33.6
	5	0	3	14.8	29.3	39.3
	5	0	4	20.7	36.0	46.8
10	5	0	5	19.6	29.2	35.6
	5	0	6	11.9	26.1	31.0
	5	0	7	20.4	36.1	46.6
	5	0	8	21.1	27.8	33.6
	5	0	9	20.2	35.8	45.4
15	5	0	10	17.4	34.4	39.7
	M±SD		17.88±3.0	31.38±3.8		38.35±6.1
	12	3	1	-6.3	0.0	36.1
	12	3	2	-19.0	13.8	30.5
	12	3	3	-15.4	18.8	32.7
20	12	3	4	-22.1	-9.1	13.9
	12	3	5	-11.0	18.6	34.3
	12	3	6	-11.4	16.3	35.1
	12	3	7	-13.3	13.8	25.7
25	12	3	8	-13.8	17.9	35.7
	12	3	9	-5.6	18.9	35.2
	12	3	10	-13.9	-9.9	11.9
	M±SD		-13.2±5.1	9.9±11.7		29.1±9.1
30	11	5	1	-27.1	D	D
	11	5	2	-14.3	-6.7	13.8
	11	5	3	-28.2	-12.9	15.3
	11	5	4	-23.8	1.0	24.3
	11	5	5	-26.1	-20.8	5.8
35	11	5	6	-6.0	13.9	36.8
	11	5	7	-22.4	-18.0	10.7
	11	5	8	-12.0	16.8	33.7
	11	5	9	-21.0	-5.2	26.7
40	11	5	10	-27.8	-6.8	17.1
	M±SD		-20.9±7.6	-4.3±13.0		20.5±10.5

*D – животное погибло к моменту контрольного взвешивания

Таблица 12 - Результаты наблюдений при однократном внутривенном введении исследуемого препарата крысам-самцам

Доза	Признаки интоксикации	Некропсия	Гибель	Примечания
5	Контроль	Отсутствует	0//10	
10	У всех животных – одышка через 1-5 минут после введения, проходящая через 40-60 минут после введения. На 5-й день не отмечается диареи	Вскрытие на 14 день: 1- НОРМА 2-НОРМА 3-светлые почки 4-НОРМА 5-НОРМА 6-почки светлые, границы рисунка нечёткие 7-надпочечники с кровоизлияниями, почки неравномерно окрашены 8-почки светлые 9-селезенка огромная, почки зернистые 10-почки с кровоизлияниями	0//10	
15				
20	2 мг/кг	Вскрытие на 14 день: 1-очень светлые почки, рисунок нечёткий, селезёнка большая 2-почки светло-коричневые, надпочечники тёмные с кровоизлияниями 3-почки с кр/изл, светло-коричневые, рисунок на разрезе четкий 4- почки с кр/изл, светло-коричневые, рисунок на разрезе четкий 5-почки светлее нормы, 6-почки ближе к норме, надпочечники тёмные и увеличены 7- печень пятнистая, почки светлые, структура внутри просматривается 8-печень светлее нормы, почки светлые 9-п/ж железа темно-бардовая, надпочечник (левый) увеличен и кронаполнен 10-п/ж железа темно-бардовая, почки с кр/изл, рисунок на разрезе смазан, цвет светлее нормы	0//10	
25	У всех животных – одышка через 1-5 минут после введения, проходящая через 40-60 минут после введения У 4 из 10 на следующий день после введения жидкий стул, к 5 дню - норма			
30				
35				
40				
45				

3 мг/кг	У всех животных – одышка через 1-5 минут после введения, проходящая через 40-60 минут после введения На 2-4 дни – диарея у 6 особей, к 5 дню – три в норме. Оставшиеся в норме к 7 дню	Вскрытие на 14 день: 1-почки с кровоизлияниями, светлые 2-почки с кровоизлияниями, светлые, на рисунке рисунок смазан 3-светлые почки с кровоизлияниями 4-надпочечники увеличены в размере, почки светлые, с кров/из 5-почки нормальные 6-почки с кровоизлияниями, на разрезе рисунок четкий 7 – почки светлые, пятнистые, неравномерноокрашены 8-светлые почки 9-почки светлые, надпочечники увеличены, почки с кровоизлияниями 10 -почки с кровоизлияниями, надпочечники увеличены и темные		
3 мг/кг	У всех животных – одышка через 1-5 минут после введения, проходящая через 40-60 минут после введения.	Отсутствует	0//10	

	5 дней - у всех диарея, проходящая в течение недели полностью			
4 мг/кг	У всех животных – одышка через 1-5 минут после введения, проходящая через 40-60 минут после введения На 2-4 дни – диарея у всех, к 5 дню – осталась у 2. Оставшиеся в норме к 7 дню.	Вскрытие на 14 день: 1-почки с кр/изл, рисунок нечёткий 2-почки пятнистые с кр/изл, рисунок чёткий 3-надпочечник справа увеличен в размере, почки нормальные 4-надпочечники немного увеличены, кр/изл, рисунок чёткий 5-пятнистые почки с кр/изл, рисунок чёткий 6-по цвету почки в норме, но на разрезе рисунок смазан, границы нечёткие 7- почки с кр/изл на пов-ти, рисунок просматривается 8- почки светлые с очагами кр/изл, рисунок на границе нечёткий, границы смазаны, надпочечники сильно увеличены. Очень большая селезенка 9-надпочечники немного увеличены, гиперемированы, почки с кр/изл на пов-ти, рисунок в норме 10 -почки в норме	0//10	

5

4,5 мг/кг	Снижение дв.активности – 5-40 минут Одышка – 1-60 минут 1-2 дн - Диарея у всех, кахексия, порфирина, снижение двиг.акт-ти (проходят постепенно в течение 10 дней или до момента гибели) Гибель через 2 дн (1), 3 дн (1), 13 дн (1)	Вскрытие (№4) – 12.03.19 н/поч-ки увеличены и гиперимированы; почки пятнистые, тёмные; на разрезе лоханка плохо просматривается / серо-красного цвета / границы не просматриваются Вскрытие выживших на 14 день: Только у крысы №5 почки светлые Остальные в норме	3//10	
-----------	---	--	-------	--

10

5 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю.	Картина вскрытия типичная: желудок переполнен либо опилками, либо водой. Печень тёмная, кровенаполнена, почки набухшие, надпочечники увеличены и тёмного цвета. Сосуды резко увеличены и кровенаполнены	2//10	Ближе к смерти независимо от дозы проявляется снижение двигательной активности/вялость (примерно за 24 часа до гибели), выделяется
---------	--	---	-------	--

15

20

				порфирин из носа и глаз. Независимо от дозы у всех диарея и истечения из анальных отверстий, общее истощение.
--	--	--	--	--

25

30

5 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю. У всех на следующий день после введения диарея/кахексия, к 5 дню продолжается у всех	(№1): почки пятнистые, с кровоизлияниями, надпочечники увеличены в 3 р., желудок переполнен, желтые испражнения, селезенка с кровоизлияниями, п/ж железа бордовая, сосуды кровенаполнены темной кровью. Печень N. Почки с желтизной, на разрезе рисунок нечёткий, границы смазаны. Вскрытие выживших на 14 день: 2 – почки светло-коричневые с зеленоватым оттенком, на разрезе рисунок расплывчатые, границы отсутствуют, надпочечники увеличены, почки мягкой	3//10	
---------	--	---	-------	--

35

40

45

5

10

15

20

		<p>консистенции, п/ж бордовая, печень неравномерно окрашена.</p> <p>3-почки светло-коричневые с кр/изл, но рисунок с чёткими границами, хорошо просматриваются. Почки мягковатые. Печень с точечными кр/изл.</p> <p>6-почки светлее нормы с болотным оттенком, мягковатые по консистенции, на разрезе рисунок просматривается, но границы нечёткие. На почках кр/изл.</p> <p>9,10 – аналогично 6</p> <p>У всех крыс очень большая селезёнка</p>		
5,1 мг/кг	<p>Снижение дв.активности – 5-40 минут</p> <p>Одышка – 1-60 минут</p> <p>1-2 дн - Диарея у всех, кахексия, сниженная эмоциональная активность, снижение двиг. акт-ти</p> <p>(проходят постепенно в течение 4 дней или до момента гибели, у 1 одной крысы – норма так и не наступила (масса в конце 130)</p>	<p>Вскрытие выживших на 14 день:</p> <p>У 1 животного надпочечники увеличены, почки очень светлые, рисунок нечёткий.</p> <p>Остальные в норме</p>	4//10	

25

30

35

40

	Гибель через 2 дн (2), 4 дн (1), 5 дн (1)			
5,4 мг/кг	<p>Снижение дв.активности – 5-40 минут</p> <p>Одышка – 1-60 минут</p> <p>1-2 дн - Диарея у всех, кахексия, сниженная эмоциональная активность, снижение двиг. акт-ти</p> <p>В норму не приходят.</p> <p>У двух особей парез задних конечностей</p> <p>Гибель через 2 дн (4), 2,5 дн (1), 4 дн (2), 5 дн (1), 6 дн (1), 9 дн (1)</p>	<p>Удалось вскрыть:</p> <p>1 - (12.03.19): почки с кровоизлияниями – рисунок не просматривается, сильно увеличены надпочечники (гиперимерированы), желудок переполнен опилками.</p> <p>2 – (12.03.19) почки с кровоизлияниями, сильно увеличены надпочечники</p> <p>5 – (12.03.19) надпочечники увеличены с гиперемией.</p> <p>Рисунка на разрезе почек нет. Все структуры окрашены в темно-красный цвет, желудок переполнен опилками</p>	10//10	
6 мг/кг	<p>Одышка от введения аналогичная контролю.</p> <p>На 2-й день – у всех диарея</p> <p>На 3-й день – диарея, у половины снижение двиг. активности, есть сгорбленные</p>	<p>Картина вскрытия типичная: желудок переполнен либо опилками, либо водой. Печень тёмная, кровенаполнена, почки набухшие, надпочечники увеличены и тёмного цвета. Сосуды резко увеличены и кровенаполнены</p>	10//10	<p>Ближе к смерти независимо от дозы проявляется снижение двигательной активности/вялость (примерно за 24 часа до</p>
8 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю. Гибель на 3-4 сутки после		10//10	

45

5

10

15

20

	введения. Наблюдаются диарея, общее истощение, адинамия перед гибелью.			гибели), выделяется
15 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю. Гибель через 1 день (2), 2 дня (4), 2,5 дня (2), 3 дня (2). Признаки интоксикации развиваются постепенно: через 12 часов - снижение двигательной активности, у оставшихся на 1--3 сутки - адинамия и распластанное положение.		10/10	порфирин из носа и глаз. Независимо от дозы у всех диарея и истечения из анальных отверстий, общее истощение.
23 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю. Гибель через 10-12 ч (2), 24 ч (4), 27 ч (1), 40 ч (1), 48 (1), 72 (1). Признаки интоксикации развиваются постепенно: через 10-12 часов у всех одышка, снижение двигательной активности, у 2 особей тремор, на 24-48 часов у оставшихся особей распластанное положение.		10/10	
30 мг/кг	Одышка от введения аналогичная контролю. Гибель за 20-24 часа – 7		10/10	

25

30

	особей, 1 особь – 40 часов, 1 особь – 45 часов. Признаки интоксикации развиваются постепенно: через 12 часов у выживших на тот момент животных – снижение двигательной активности, одышка, в клетке обнаружены следы диареи, у двух особей тремор. К 24-48 ч у оставшихся крыс распластанное положение и адинамия.			
--	--	--	--	--

Таблица 13 - Зависимость доза/эффект при внутривенном введении исследуемого препарата крысам-самцам

35

Зависимость доза/эффект при введении						
Исследуемый лекарственный препарат						
Доза мг/кг	4	4.5	5	5.1	5.4	
Летальность	0	3	5	4	10	
LD50	4,9±0,3 мг/кг					

40

45

Таблица 14 - Динамика массы тела крыс-самцов в эксперименте с однократным введением исследуемого препарата и контрольной группы животных в % от исходной массы

Группа	Доза мг/кг	№ животного	5 дней	10 дней	14 день	
5	6	0	1	10.4	22.9	28.1
	6	0	2	12.7	25.4	32.8
	6	0	3	10.6	31.2	39.7
	6	0	4	13.6	31.5	41.8
	6	0	5	16.8	38.4	53.2
10	6	0	6	10.8	17.8	18.9
	6	0	7	4.7	17.1	24.4
	6	0	8	8.1	22.2	24.3
	6	0	9	10.4	26.9	37.3
	6	0	10	7.8	21.2	31.6
15	M±SD		10.59±3.3	25.46±6.7	33.21±10.1	
	11	3	1	-1.5	17.3	20.8
	11	3	2	-11.2	5.9	10.1
	11	3	3	-5.1	16.4	20.0
20	11	3	4	10.8	25.1	29.1
	11	3	5	-9.4	11.4	16.8
	11	3	6	5.5	20.1	27.1
	11	3	7	1.4	19.7	26.4
25	11	3	8	-2.4	17.1	23.8
	11	3	9	2.0	13.2	24.9
	11	3	10	7.6	26.1	29.4
	M±SD		-0.2±7.1	17.2±6.1	22.8±6.0	
30	12	4	1	6.1	25.5	35.2
	12	4	2	-15.2	2.5	11.7
	12	4	3	-5.9	16.3	24.6
	12	4	4	0.0	22.2	31.7
	12	4	5	-3.0	19.1	28.1
35	12	4	6	-4.1	16.3	28.1
	12	4	7	-13.7	5.9	18.0
	12	4	8	-17.1	-10.5	1.0
	12	4	9	-9.2	14.5	21.7
40	12	4	10	-14.4	-1.9	1.0
	M±SD		-7.7±7.6	11.0±11.5	20.1±12.1	

Таблица 15 - Дизайн исследования хронической токсичности исследуемого препарата

Группа №	Способ введения	Доза (Т)	Доза (мкг/кг)	Кол-во
Аутбредные крысы-самцы				
Контроль (Раствор Плюроники в Гемодезе)				
1	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	Контроль	---	10
Исследуемый лекарственный препарат				
2	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1	150	10
3	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1,25	188	10
4	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1,5	225	10
Препарат сравнения - субстанция мономилауристин Е				
5	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1	10	10
Кролики-самцы породы «Советская шиншилла»				
Контроль (Раствор Плюроники в Гемодезе)				
6	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	Контроль	---	6
Исследуемый лекарственный препарат				
7	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1	81	6
8	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1,25	102	6
9	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1,5	122	6
Препарат сравнения - субстанция мономилауристин Е				
10	Внутривенно, 1 раз в 3 недели	1	5,4	6

Таблица 16 - Результаты наблюдений за крысами-самцами

Номер группы/Доза	Признаки интоксикации	Некропсия	Гибель	Примечания
1 (Контроль)	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//10	Нет
2 исследуемый препарат 150 мкг/кг	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//10	Нет
3 (исследуемый препарат 188 мкг/кг)	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//10	Нет
4 (исследуемый препарат 225 мкг/кг)	Через 2-3 дня после первого введения исследуемого лекарственного препарата у всех животных в группе началась диарея, которая закончилась на 6-7 сутки. Через 2-3 дня после второго введения исследуемого препарата у животных началась диарея.	Отсутствует	0//10	Нет
5 (ММАЕ 10 мкг/кг)	30.04.19: у животных отмечалось нарушение координации движения, одышка, диарея, потеря в массе □15-20 г	№1, 5, 6: сильно раздуты желудок и кишечник; надпочечники увеличены □2 раза; в почках кровь, лоханка розового цвета. №3: желудок переполнен зеленовато-желтым жидким содержимым; слизистая с	10//10	№ 1, 2, 4, 5,6 – гибель 01.05.19 (3 день)

5	01.05.19: крыса №1 – распластанное положение, тремор, парез задних конечностей; крыса №2 – распластанное положение, парез задних конечностей; крысы №3-5 – нарушение координации движения, снижение двигательной активности, парез задних конечностей; крыса №6 – распластанное положение, тремор, парез задних конечностей; крыса №9 – нарушение координации движения, снижение двигательной активности	кровоизлияниями и язвами; почки бледные, лоханка бледная; надпочечники увеличены, гиперемированы; поджелудочная железа темная; печень зернистая, бледноватая.	№ 7, 8, 10 – гибель ночью с 30.04.19 на 01.05.19 (1,5 суток) № 9 – гибель ночью с 01.05.19 на 02.05.19 (2,5 суток) № 3 – гибель 20.05.19 (на следующий день после второго введения)
10	02.05.19: крыса №3 – одышка, тремор, шаткая походка, диарея желтыми испражнениями		
15	20.05.19: крыса №3 – одышка, распластанное положение, парез задних конечностей, выделения порфирина (глаза)		

Таблица 17 - Результаты наблюдений за кроликами-самцами.

Номер группы/Доза	Признаки интоксикации	Некропсия	Гибель	Примечания
6 (Контроль)	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//6	Нет
7 (исследуемый препарат 81 мкг/кг)	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//6	Нет
8 (исследуемый препарат 102 мкг/кг)	Без признаков интоксикации	Отсутствует	0//6	Нет
9 (исследуемый препарат 122 мкг/кг)	После введения исследуемого лекарственного препарата снижалось потребление корма и воды.	Отсутствует	1//6	№2 – гибель в ночь с 25.05.19 на 26.05.19 (через 6,5 суток после второго введения)
10 (ММАЕ 5,4 мкг/кг)	После введения референтного лекарственного препарата снижалось потребление корма и воды. Примерно через день после введения и до гибели наблюдалось поверхностное дыхание, адиагния.	№4: мочевой пузырь переполнен; печень бледная, зернистая, дряблая; селезенка бледная с сероватым оттенком; тимус с кровоизлияниями; рисунок почек сглажен, бледные; желудок полупустой с содержимым желто-зеленого цвета	6//6	Кролики № 1,2,3,5 – гибель на 3 день (01.05.19) Кролик №4 – гибель на 4 день (02.05.19)

Таблица 18 - Физико-химические свойства конъюгата (I)

Субстанция	Молекула	HD	HA	PSA/TPSA	Объем молекулы	pKa (Кислота)	pKa (Щелоч)	Log P	Log S
Конъюгат (I)	C114H165ClN20O26	18	27	650.15 Å ²	2113.27 Å ³	3,9	0,37	5,28	-9,53

Таблица 19

Композиция для приготовления лиофилизата		Количество на 1 дозировку
5	Конъюгат (I)	5,00 мг
	Поливинилпирролидон	20,0 мг
	Смесь Трет-бутанол: цитратный буфер pH 4.5 (75:25)	До 1,0 мл
	Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
10	Спирт этиловый, 95%	0,430 г
	Полисорбат 80	0,570 г

Таблица 20

Композиция для приготовления лиофилизата		Количество на 1 дозировку
15	Конъюгат (I)	5,00 мг
	Поливинилпирролидон	20,0 мг
	Смесь Трет-бутанол: вода (75:25)	До 1,0 мл
	Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
20	Спирт этиловый, 95%	0,430 г
	Полисорбат 80	0,570 г

Таблица 21

Композиция для приготовления лиофилизата		Количество на 1 дозировку
25	Конъюгат (I)	5,00 мг
	Поливинилпирролидон	20,0 мг
	Смесь спирт изопропиловый: цитратный буфер pH 4.5 (80:20)	До 1,0 мл
	Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
30	Спирт этиловый, 95%	0,430 г
	Полисорбат 80	0,570 г

Таблица 22

Композиция для приготовления лиофилизата		Количество на 1 дозировку
35	Конъюгат (I)	5,00 мг
	Поливинилпирролидон	20,0 мг
	Смесь спирт изопропиловый: вода (80:20)	До 1,0 мл
	Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
40	Спирт этиловый, 95%	0,430 г
	Полисорбат 80	0,570 г

45

Таблица 23

Композиция для приготовления лиофилизата	Количество на 1 дозировку
Конъюгат (I)	5,00 мг
Поливинилпирролидон	20,0 мг
Смесь спирт изопропиловый: цитратный буфер pH 4.5 (50:50)	До 1,0 мл

Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
Спирт этиловый, 95%	0,430 г
Полисорбат 80	0,570 г

Таблица 24

Композиция для приготовления лиофилизата	Количество на 1 дозировку
Конъюгат (I)	5,00 мг
Поливинилпирролидон	20,0 мг
Смесь спирт изопропиловый: вода (50:50)	До 1,0 мл
Растворитель для лиофилизата	Количество на 1 дозировку
Спирт этиловый, 95%	0,430 г
Полисорбат 80	0,570 г

Таблица 25

	Соотношение этанол/ полисорбат 80	Поглощение до фильтрации	Поглощение после фильтрации
1	57/43	0,055	0,050
2	52/48	0,058	0,052
3	45/55	0,053	0,047
5	32/68	0,057	0,049
6	19/81	0,199	0,049
7	9/91	0,294	0,053

Таблица 26 - Изучение стабильности лиофилизата содержащего Конъюгат (I) в режиме ускоренного хранения при 25°C

Показатель качества	0	3 месяца	12 месяцев
ОПИСАНИЕ - Лيوфилизированная масса или порошок от белого до желтовато-белого цвета. Восстановленный лиофилизат – прозрачный раствор от бесцветного до светложелтого цвета.	Соответствует		
ПОДЛИННОСТЬ	Соответствует		
ПРОЗРАЧНОСТЬ	Соответствует		

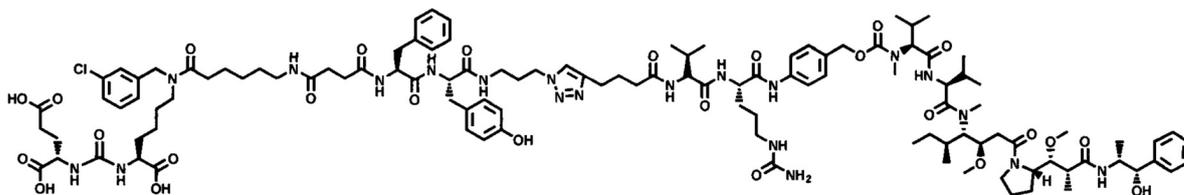
pH - Значение pH раствора должно быть от 4,5 до 6,5	5,86	5,52	5,60
ВОДА - Не более 5,0 %	1,26	1,45	1,83
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ	95%	94 %	93%
РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	5%	6%	7%

Таблица 27 - Изучение стабильности лиофилизата содержащего ПСМА-ММАЕ в режиме естественного хранения при температуре хранения минус (20 ± 2) °С

Показатель качества	0	3 месяца	12 месяцев
ОПИСАНИЕ - Лиофилизованная масса или порошок от белого до желтовато-белого цвета. Восстановленный лиофилизат – прозрачный раствор от бесцветного до светло-желтого цвета.	Соответствует		
ПОДЛИННОСТЬ	Соответствует		
ПРОЗРАЧНОСТЬ	Соответствует		
pH- Значение pH раствора должно быть от 4,5 до 6,5	4,35	4,31	4,71
ВОДА- Не более 5,0 %	0,66	0,73	1,20
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ	95%	95 %	94%
РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	5 %	5 %	6%

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат формулы (I)



(I).

2. Конъюгат по п. 1 для терапии опухоли предстательной железы, экспрессирующей ПСМА.

3. Конъюгат по п. 1 для торможения роста опухоли предстательной железы, экспрессирующей ПСМА.

4. Композиция для приготовления лиофилизата, включающая конъюгат по п. 1 в эффективной дозе, фармацевтически приемлемый наполнитель и растворитель.

5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что в качестве наполнителя содержит поливинилпирролидон.

6. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что в качестве растворителя выбирают изопропиловый, трет-бутиловый спирт или их смесь с водой или цитратным буферным раствором.

7. Лекарственная форма для терапии опухоли предстательной железы, экспрессирующей ПСМА, полученная путем лиофилизации композиции по любому из пп. 4-6.

8. Лекарственная форма для торможения роста опухоли предстательной железы, экспрессирующей ПСМА, полученная путем лиофилизации композиции по любому из пп. 4-6.

9. Применение растворителя, содержащего этиловый спирт 95% и полисорбат 80 при массовом соотношении (30-60):(70-40), соответственно, для лекарственной формы по п. 7 или 8.

10. Раствор для инфузий или инъекций, содержащий лекарственную форму по п. 7

или 8, восстановленную растворителем, содержащим этиловый спирт 95% и полисорбат 80 при массовом соотношении (30-60):(70-40), соответственно.

11. Раствор по п. 10, отличающийся тем, что восстановление растворителем проводят в объемном соотношении, рассчитанном исходя из того, что 1 объемная часть растворителя приходится на 1 объемную часть композиции для приготовления лиофилизата по любому из пп. 4-6.

12. Раствор по п. 10, отличающийся тем, что разбавлен как минимум в 10 раз физиологическим раствором.

10

15

20

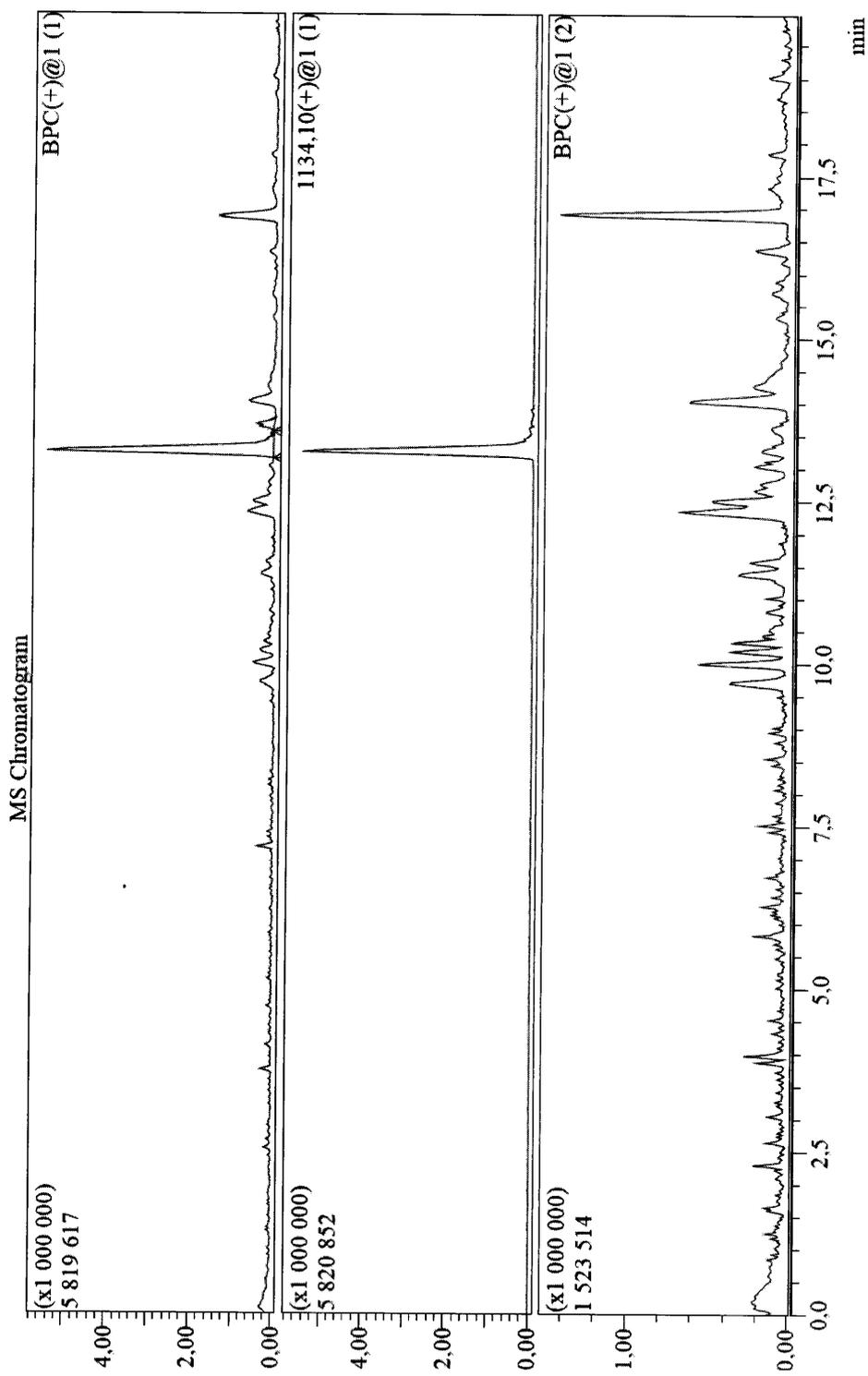
25

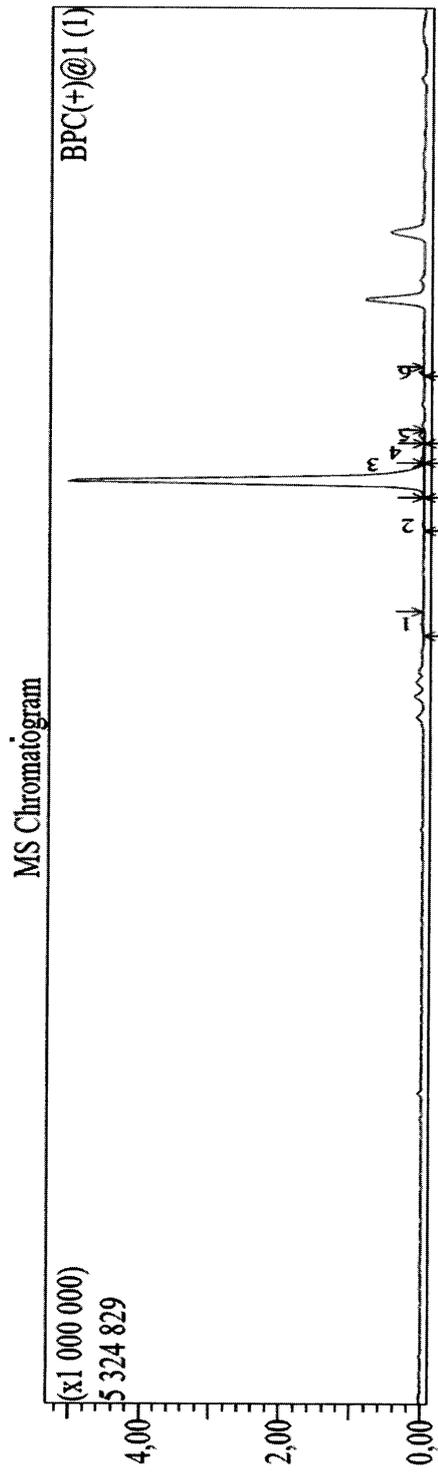
30

35

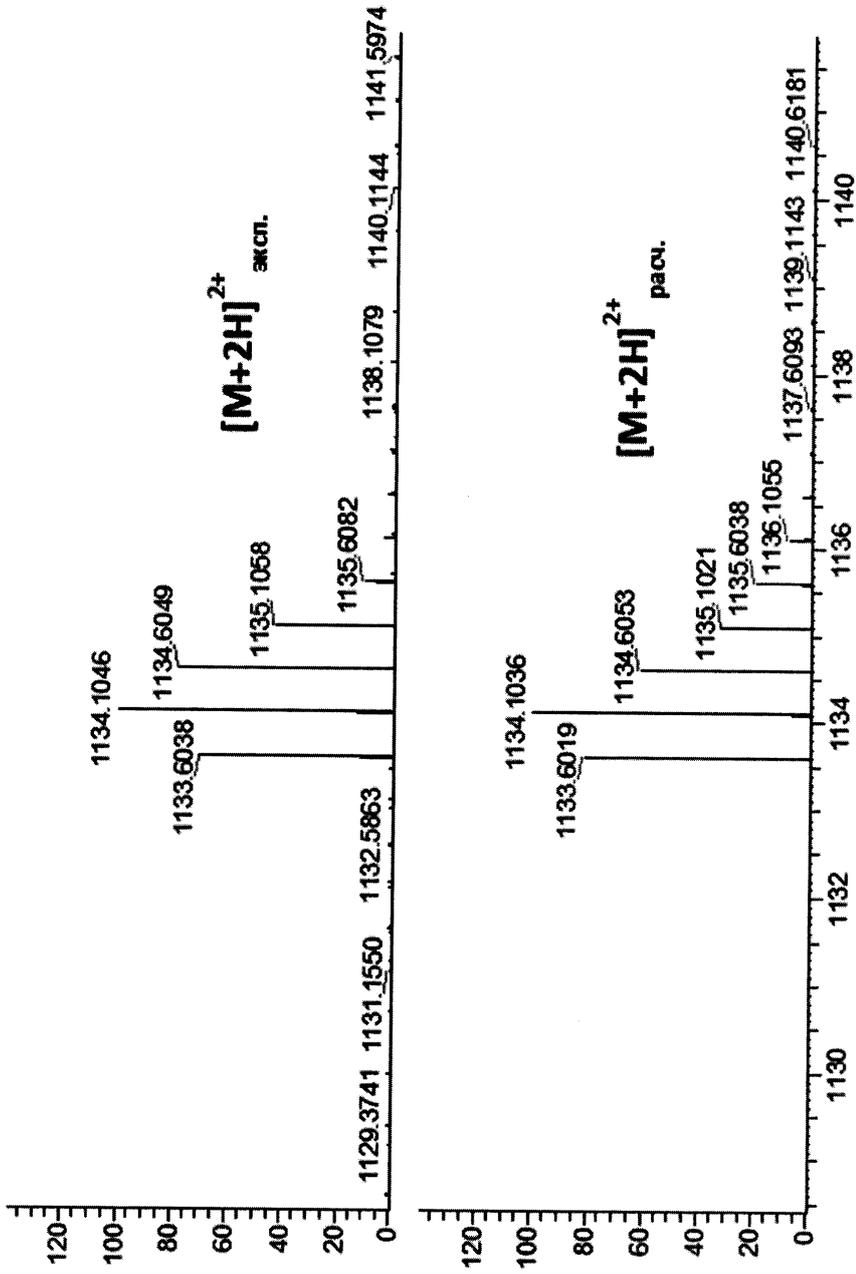
40

45

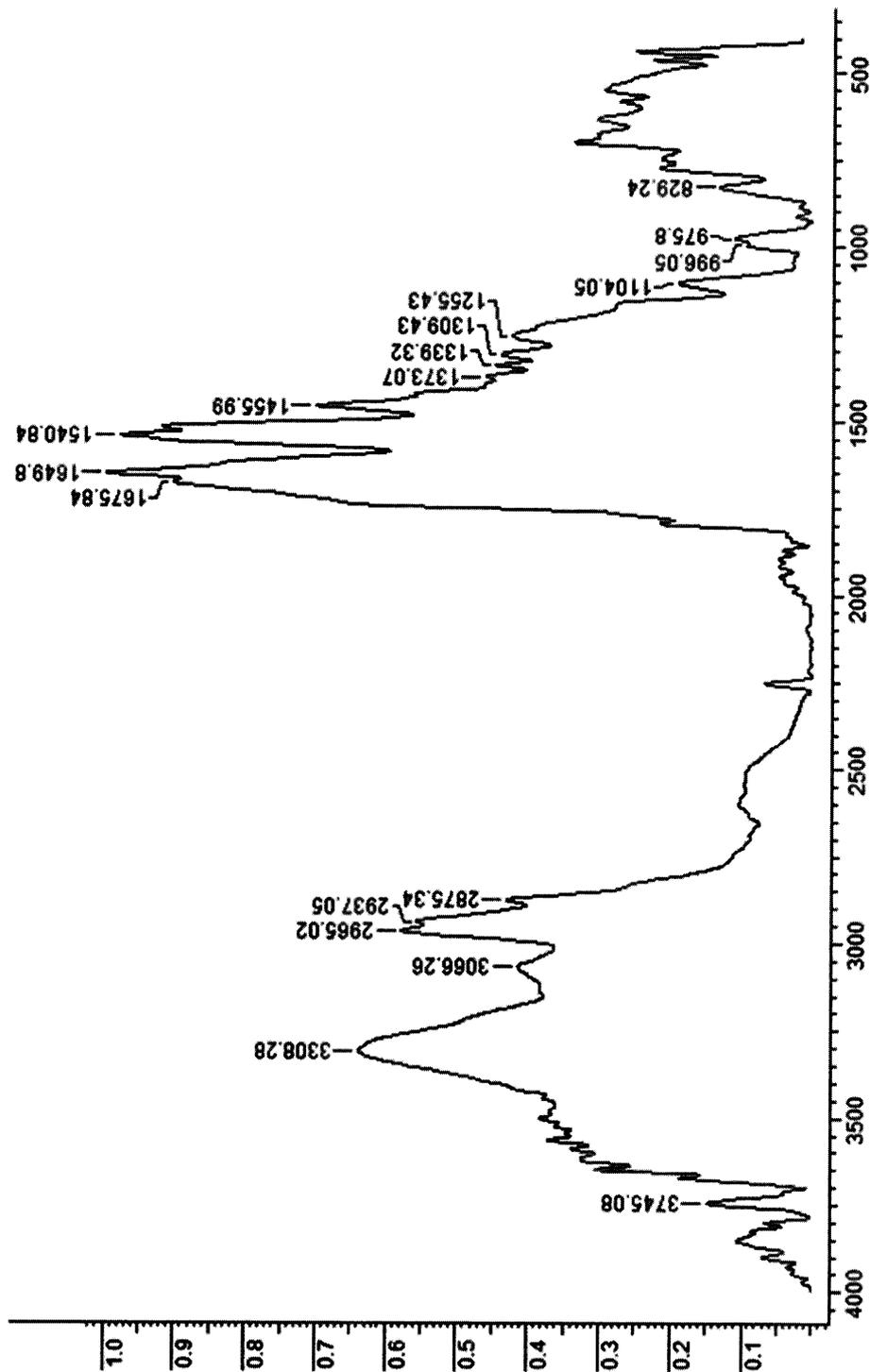




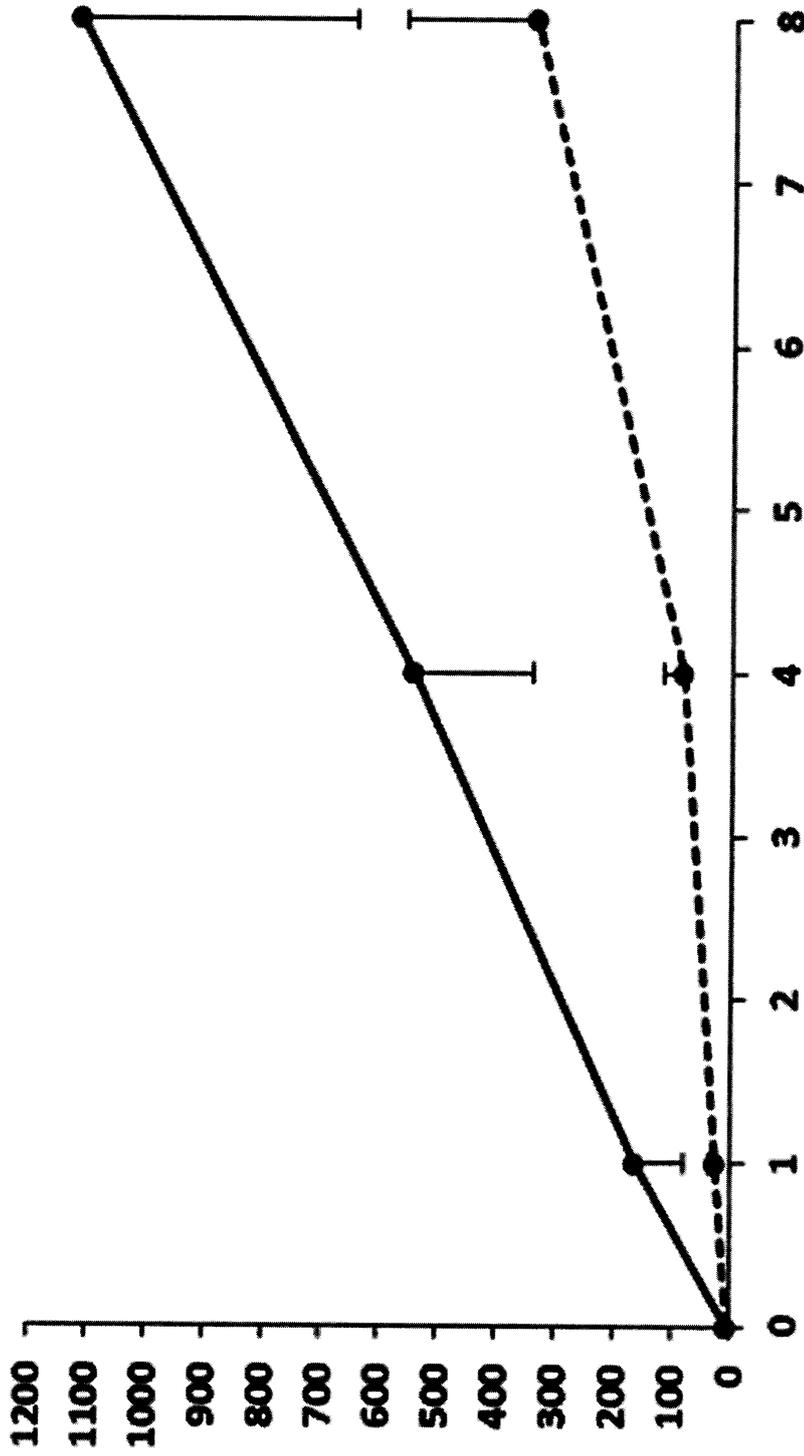
Фиг. 2



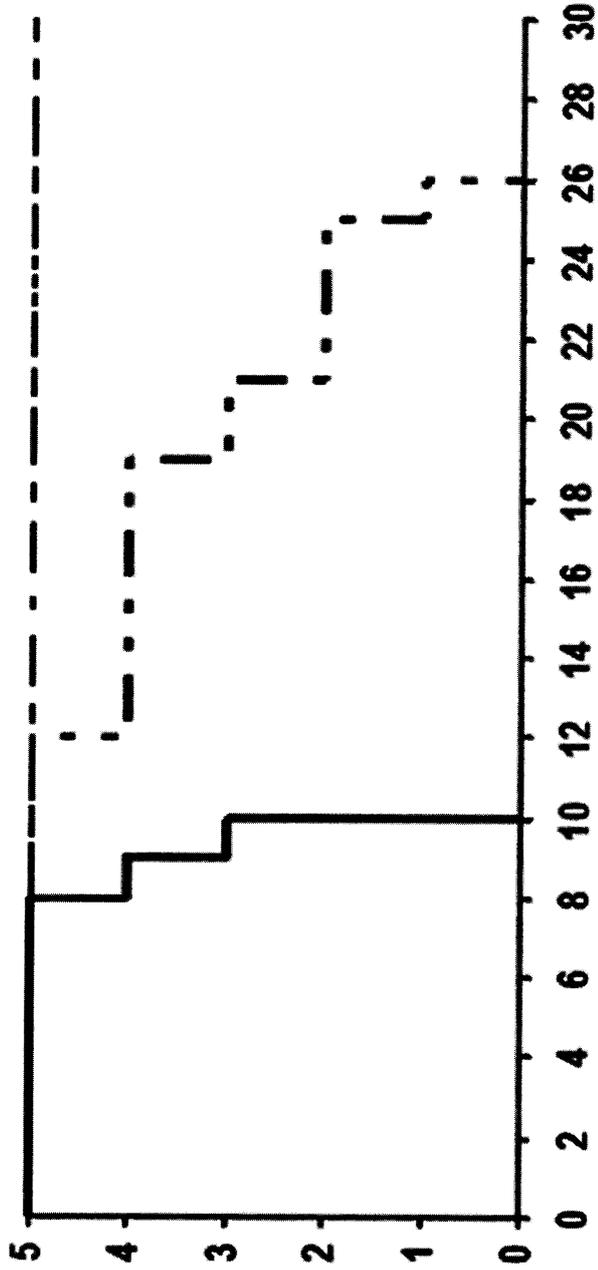
Фиг. 3



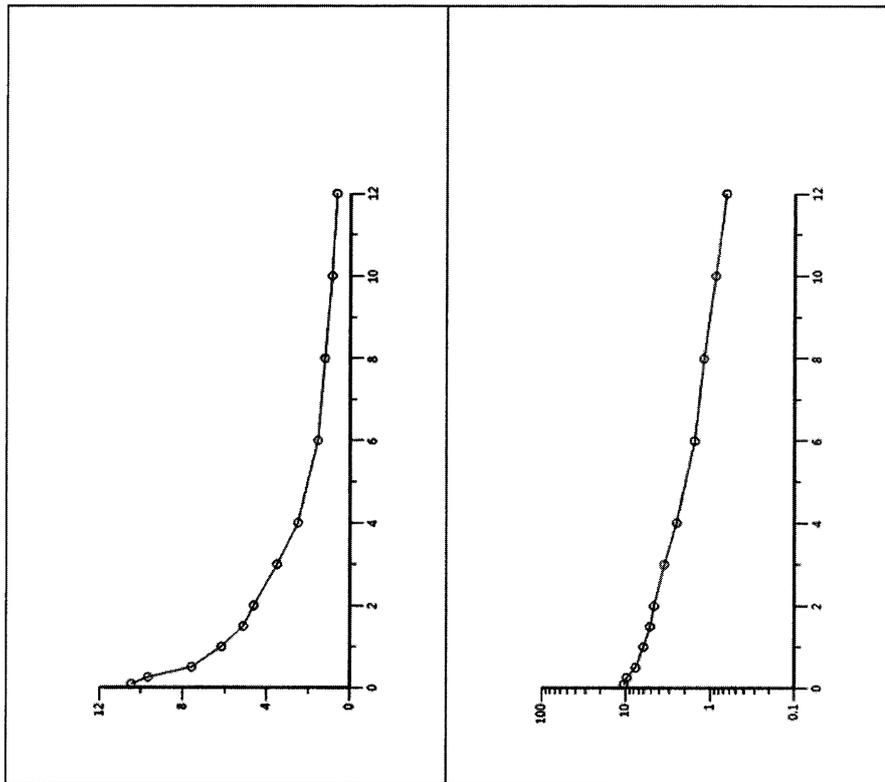
Фиг. 4



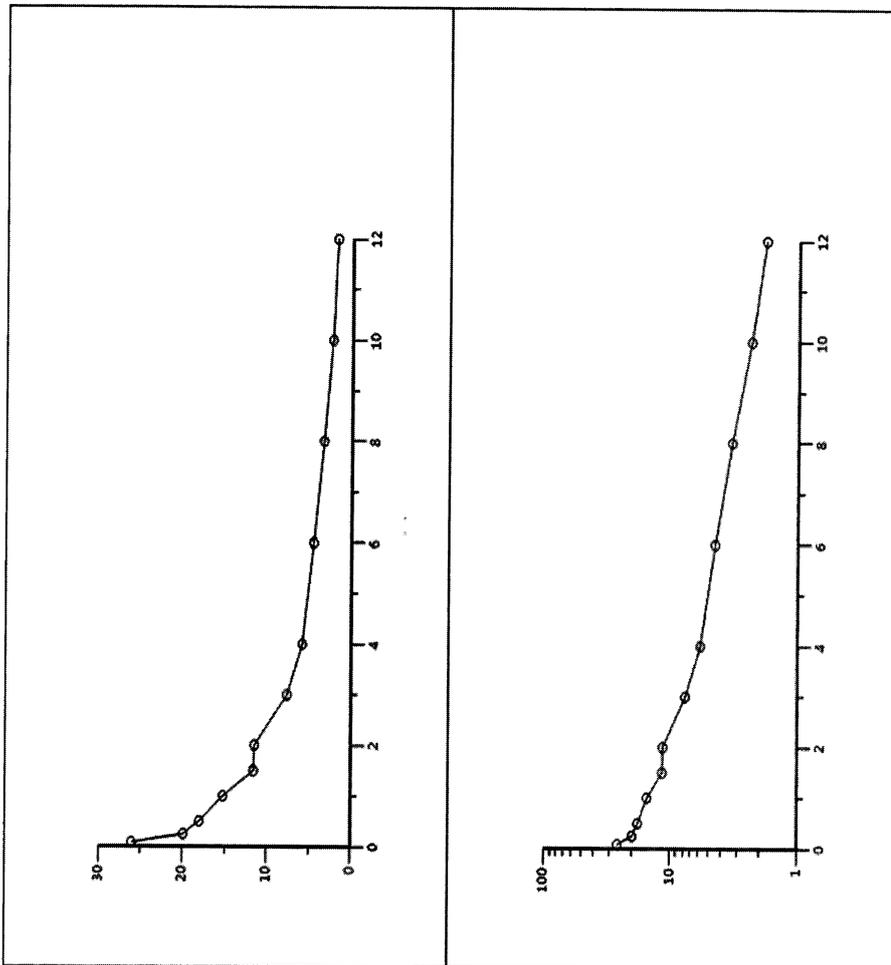
Фиг. 5



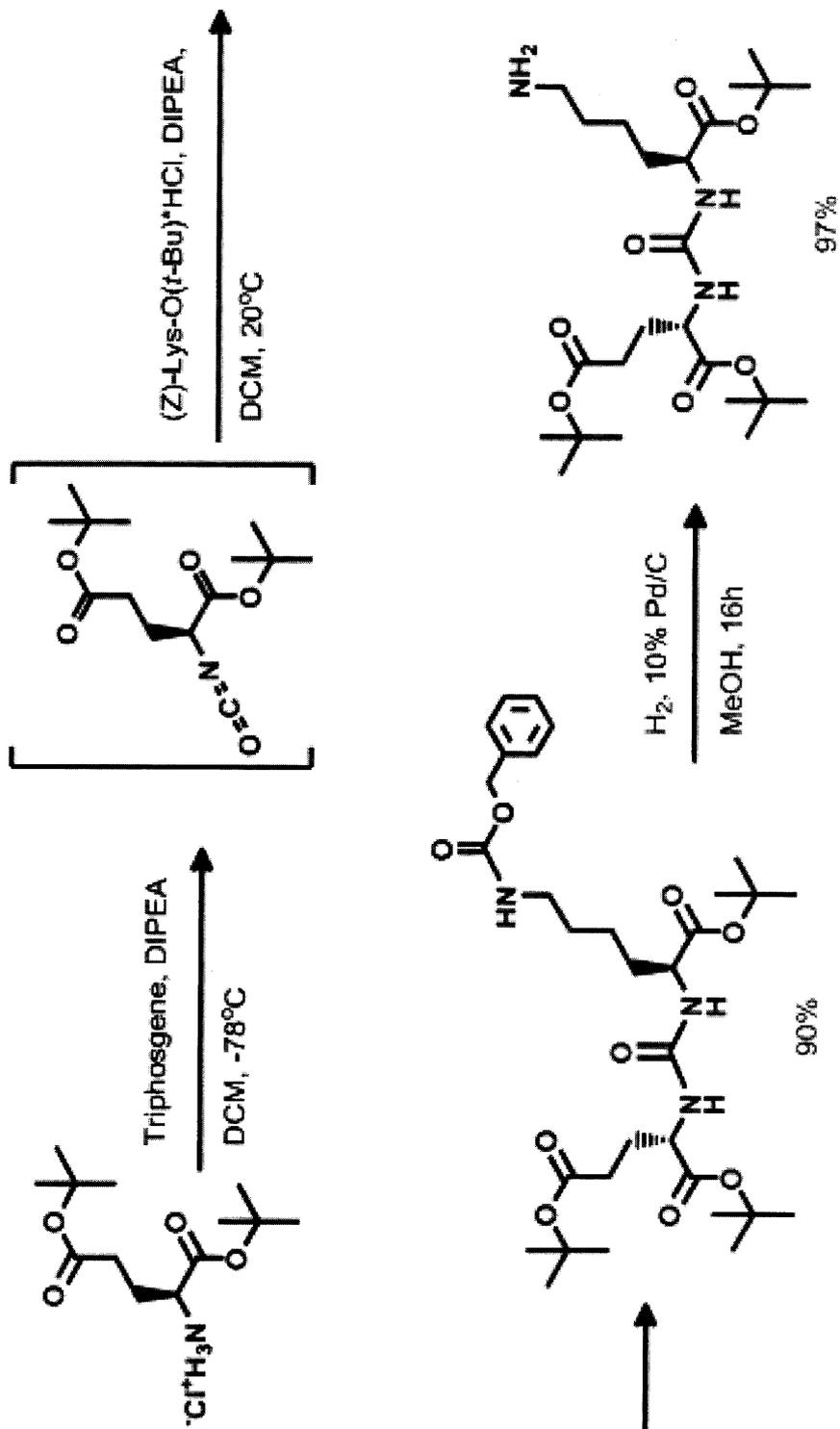
Фиг. 6



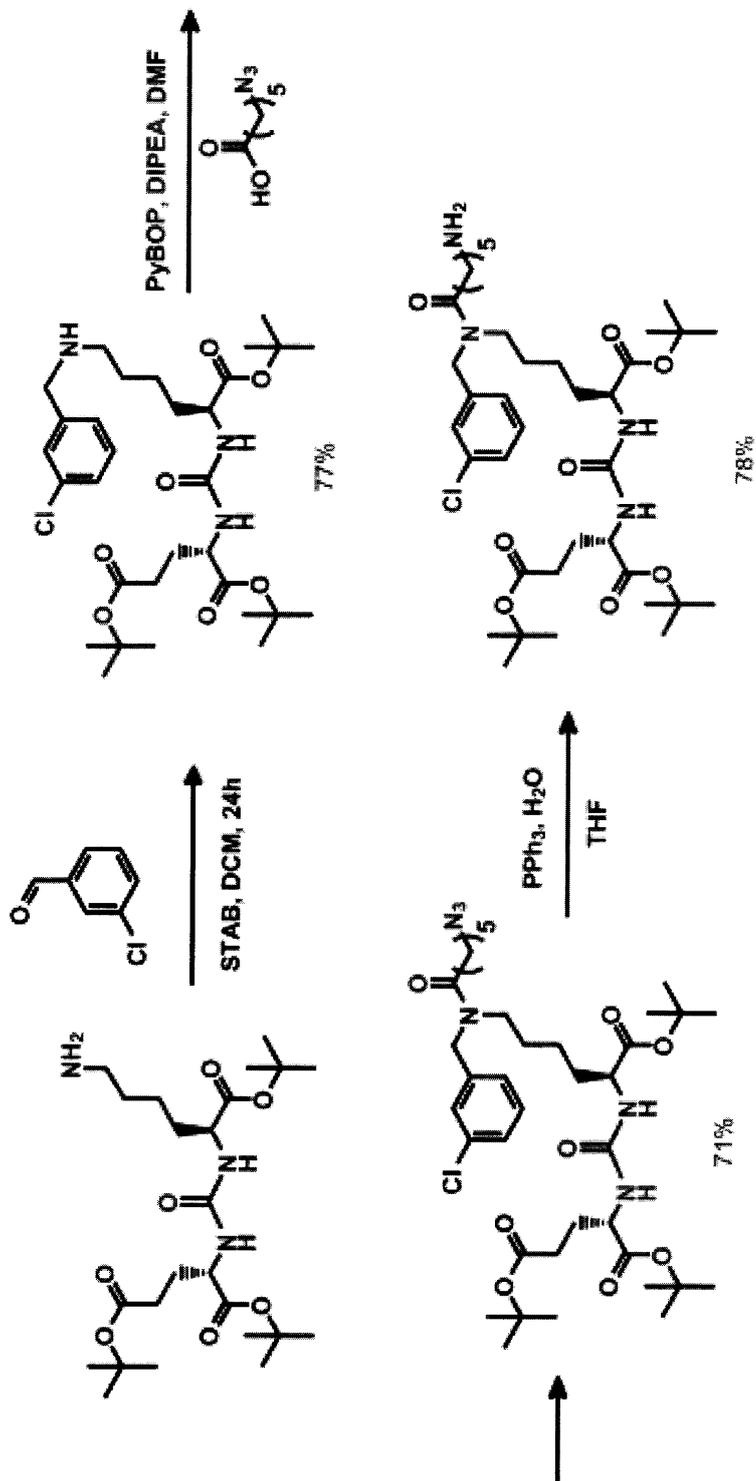
Фиг. 7



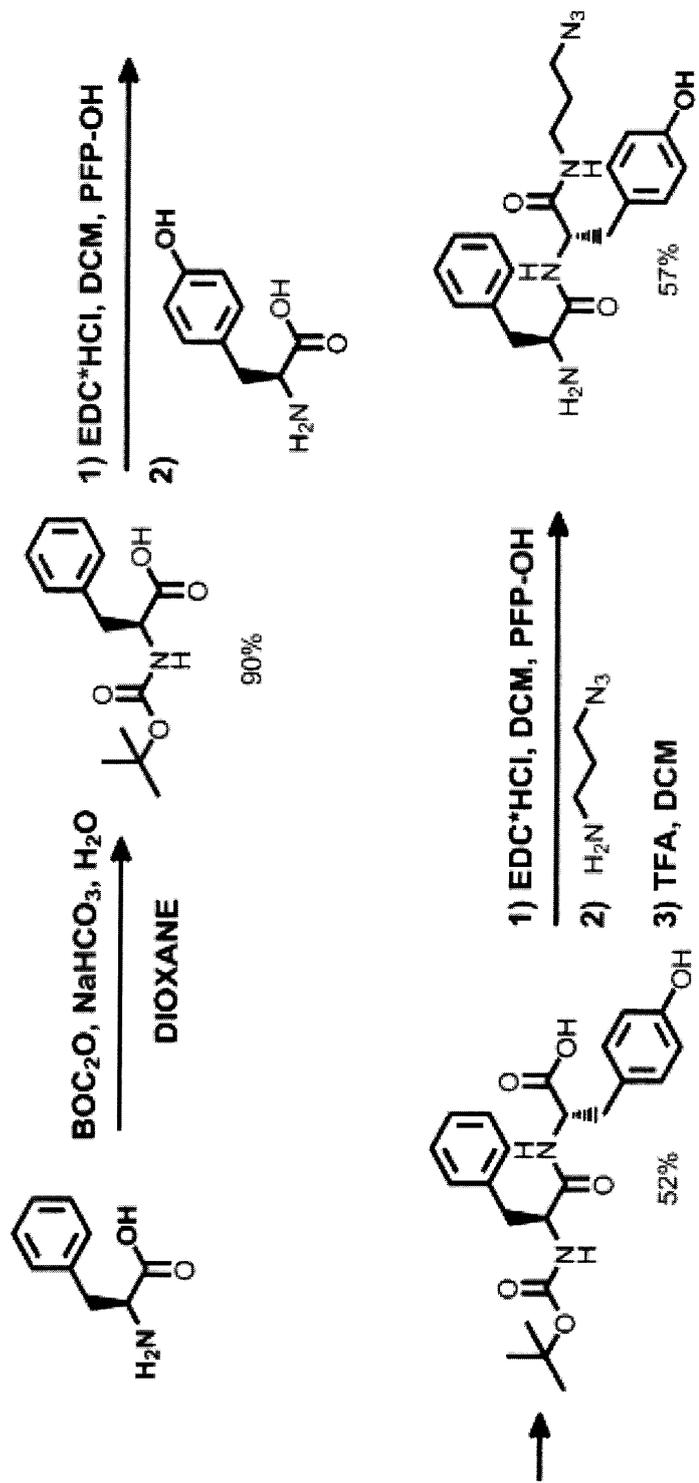
Фиг. 8



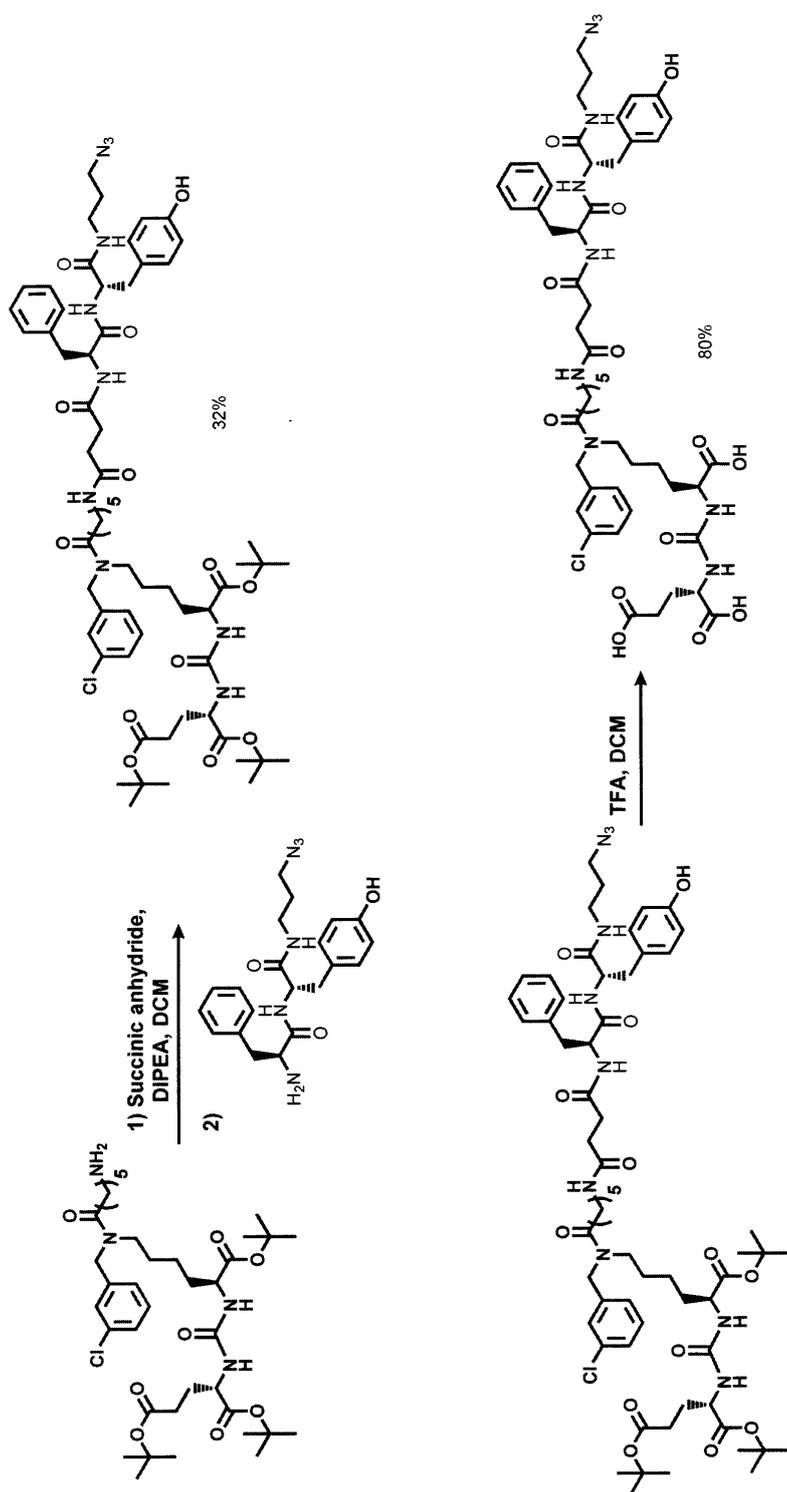
Фиг. 9



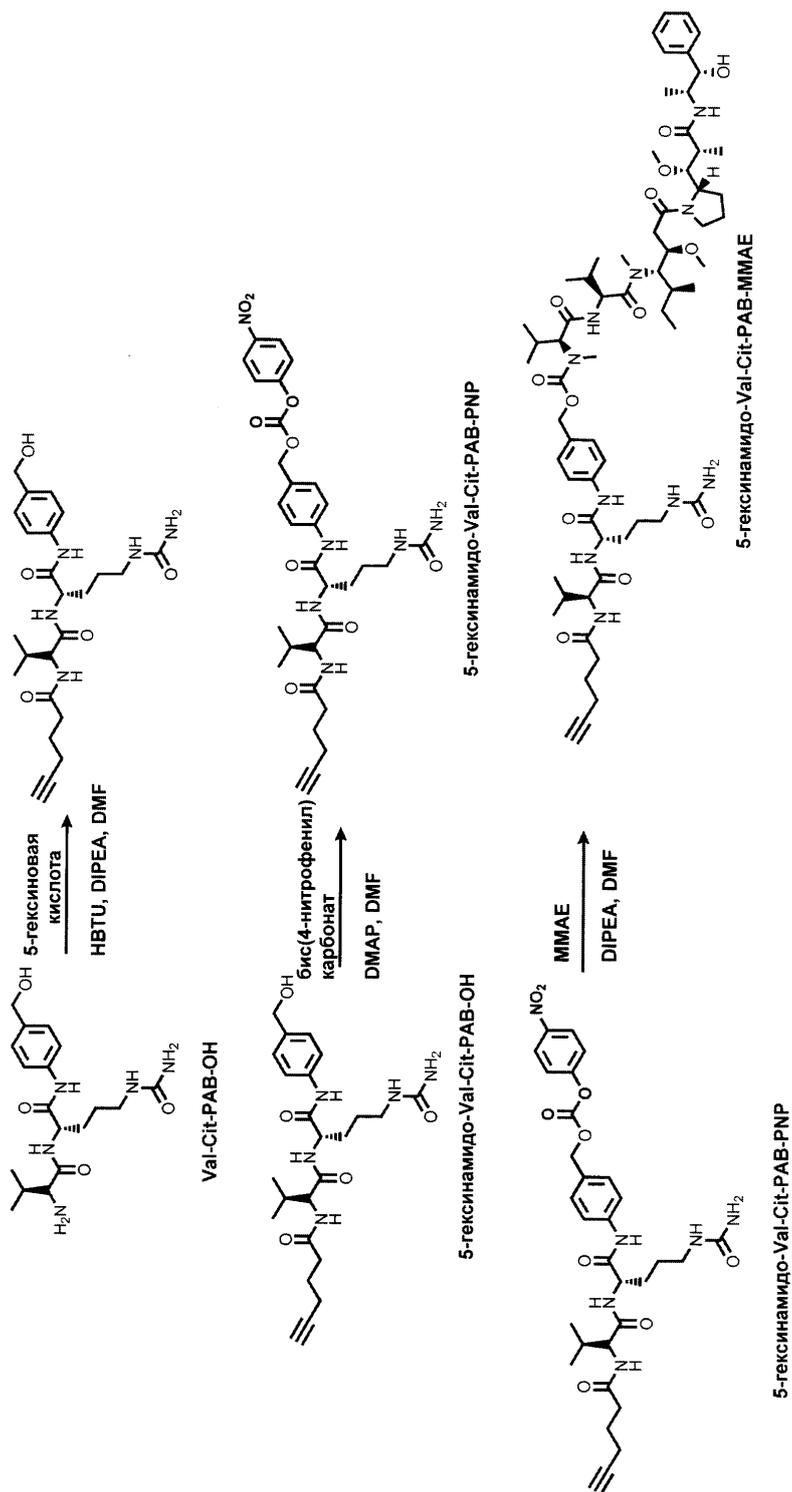
Фиг. 10



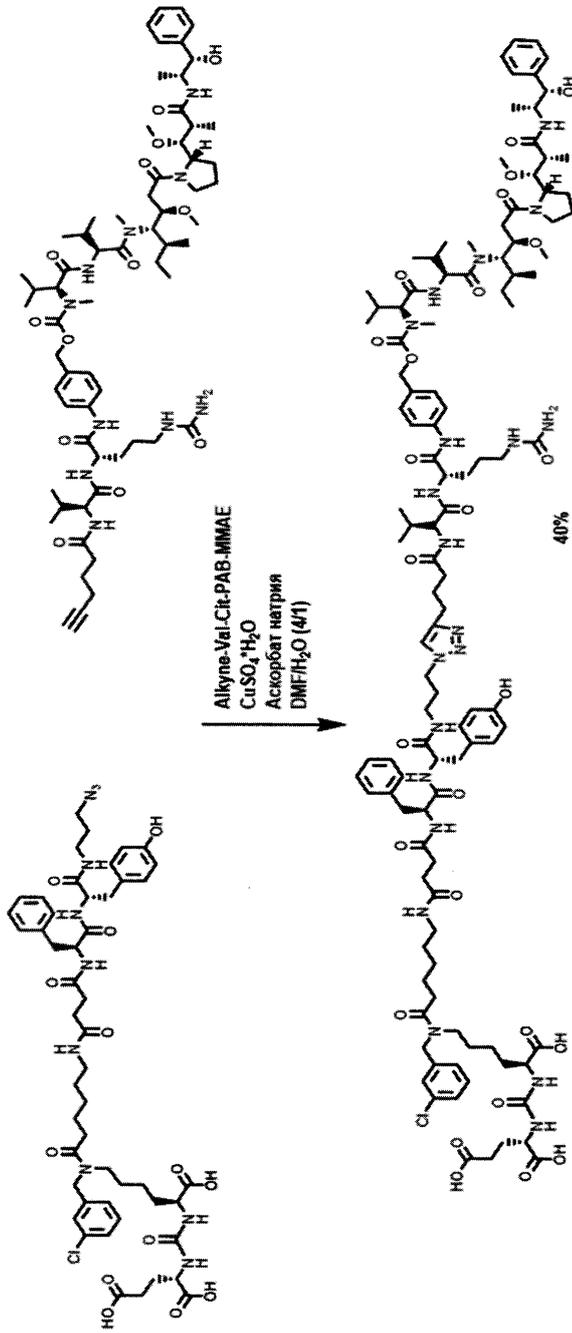
Фиг. 11



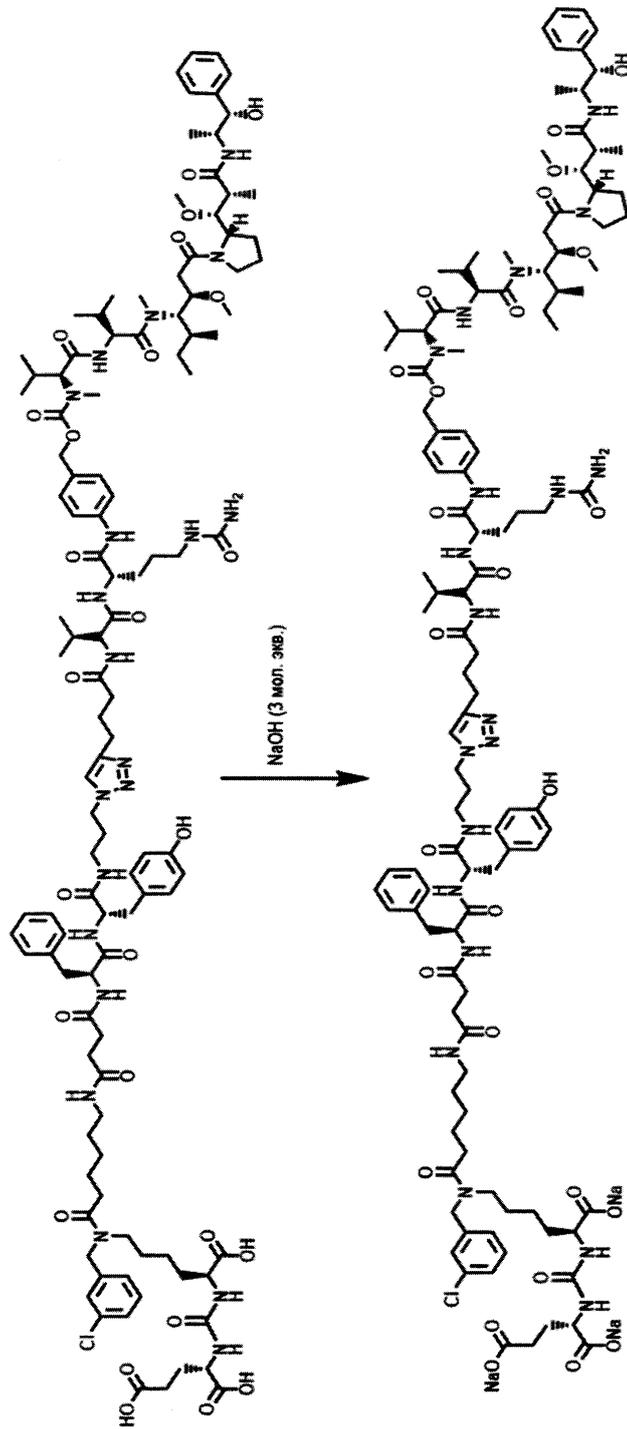
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15