



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.07

(21) Номер заявки
202291872

(22) Дата подачи заявки
2021.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 47/61* (2017.01)
C08B 37/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ СИНТЕЗА КОНЬЮГАТА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПАКЛИТАКСЕЛА

(31) 102020000008209

(32) 2020.04.17

(33) IT

(43) 2022.12.05

(86) PCT/IB2021/053096

(87) WO 2021/209935 2021.10.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
Кампизи Моника, Гуаризе Кристиан,
Пиццокарро Карло (IT)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(56) WO-A2-2004035629
FRANCESCA LEONELLI ET AL.: "Design,
Synthesis and Applications of Hyaluronic Acid-
Paclitaxel Bioconjugates", MOLECULES, vol. 13,
no. 2, 12 February 2008 (2008-02-12), pages
360-378, XP055757515, ISSN: 1433-1373, DOI:
10.3390/molecules13020360, abstract, page 365 -
page 366

FRANCESCA LEONELLI ET AL.: "A
New and Simply Available Class of Hydrosoluble
Bioconjugates by Coupling Paclitaxel to Hyaluronic
Acid through a 4-Hydroxybutanoic Acid Derived
Linker", HELVETICA CHIMICA ACTA, vol. 88,
no. 1, 2005, pages 154-159, XP055270146, ISSN:
0018-019X, DOI: 10.1002/hlca.200490289, abstract,
page 156 - page 157

SILVIA ARPICCO ET AL.: "Hyaluronic Acid
Conjugates as Vectors for the Active Targeting

of Drugs, Genes and Nanocomposites in Cancer
Treatment", MOLECULES, vol. 19, no. 3, 17 March
2014 (2014-03-17), pages 3193-3230, XP055414782,
DOI: 10.3390/molecules19033193, abstract, page
3196, figures

ZHANG HAIQUN ET AL.: "Current research
on hyaluronic acid-drug bioconjugates", EUROPEAN
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol.
86, 27 August 2014 (2014-08-27), pages 310-317,
XP029048584, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/
J.EJMECH.2014.08.067, abstract, page 311 - page 313

ROSATO A. ET AL.: "HYTAD1-p20:
A new paclitaxel-hyaluronic acid hydrosoluble
bioconjugate for treatment of superficial bladder
cancer", UROLOGIC ONCOLOGY: SEMINARS
AND ORIGINAL INVESTIGATIONS, vol. 24,
no. 3, May 2006 (2006-05), pages 207-215,
XP028071920, ISSN: 1078-1439, DOI: 10.1016/
J.UROLONC.2005.08.020 [retrieved on 2006-05-01],
abstract, page 208, paragraph 2.1 - paragraph 2.3,
figures

SARAVANAKUMAR G. ET AL.: "Hyaluronic
acid-based conjugates for tumor-targeted drug
delivery and imaging", JOURNAL OF
BIOMEDICAL NANOTECHNOLOGY, vol. 10,
no. 1, 31 December 2013 (2013-12-31), pages
17-31, XP009514109, ISSN: 1550-7033, DOI:
10.1166/JBN.2014.1761, Retrieved from the Internet:
URL:1077952576, page 20 - page 21, figures

I, LARIA DE STEFANO ET AL.:
"Hyaluronic acid-paclitaxel: effects of intraperitoneal
administration against CD44(+) human ovarian cancer
xenografts", CANCER CHEMOTHERAPY AND
PHARMACOLOGY, vol. 68, no. 1, 17 September
2010 (2010-09-17), pages 107-116, XP019919939,
ISSN: 1432-0843, DOI: 10.1007/S00280-010-1462-2,
abstract, page 108, figures

WO-A1-2009130564

WO-A1-2009003624

WO-A1-2020084525

(57) Описаны промышленный способ синтеза конъюгата гиалуроновой кислоты и паклитаксела, полученный путем введения спейсера/линкера 4-броммасляной кислоты между гиалуроновой кислотой и паклитакселом, где указанный конъюгат отличается высокой чистотой, и соответствующие фармацевтические композиции для применения в лечении множественных форм рака.

Задача изобретения

В настоящем изобретении описан способ промышленного синтеза конъюгата гиалуроновой кислоты и паклитаксела, полученного согласно способу синтеза между молекулами гиалуроновой кислоты (ГК) и паклитаксела путем введения спейсера/линкера 4-броммасляной кислоты между гиалуроновой кислотой и указанным выше химиотерапевтическим веществом согласно оригинальному способу синтеза и очистки, который обеспечивает чистоту конъюгата в его конечной форме.

Область техники

Паклитаксел (Taxol®) представляет собой противораковое средство, осуществляющее свою антипролиферативную активность путем воздействия на организацию микротрубочек клеточной цитоскелетной системы: ингибируя деполяризацию вышеуказанных микротрубочек, он предотвращает их нормальную динамическую реорганизацию, которая происходит во время митотического клеточного деления (Manfredi J.J. et al., *J. Cell Biol.*, 1982, 94:688-696).

Основными терапевтическими показаниями для паклитаксела являются его применение в терапии распространенного рака молочной железы, в терапии рака легких, в лечении рака яичников, рака мочевого пузыря, предстательной железы и эндометрия.

Паклитаксел представляет собой нерастворимое в воде соединение, и, следовательно, фармацевтическая композиция, в которой он используется в настоящее время, включает его смешивание с Cremophor EL - этиловым спиртом, (Pfeifer R.W. et al., *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1993, 50:2520-2521) в соотношении 1:1, и именно в этой форме его обычно вводят путем непрерывной внутривенной инфузии. Присутствие Cremophor EL является основной причиной негативных реакций, которые обычно возникают при введении паклитаксела, т.е. простых приступов крапивницы, одышки и бронхоспазма, вплоть до анафилактического шока. По этой причине все пациенты, получающие лечение фармацевтической композицией паклитаксел-Cremophor EL, должны перед началом лечения пройти процедуру согласно протоколу премедикации, которая состоит из введения дексаметазона, возможно в сочетании с антигистаминным средством.

Таким образом, авторы настоящего изобретения могут с уверенностью заявить, что препарат Taxol®, который в настоящее время используется в клинической практике (а также способ его введения), представляет собой ограничение его терапевтической эффективности. По этой причине исследования в настоящее время ориентированы как на синтез пролекарств/водорастворимых конъюгатов паклитаксела, так и на новые препараты вышеупомянутого противоракового лекарственного средства.

Паклитаксел представляет собой алкалоид, который в настоящее время получают полусинтетическим путем из одного из его предшественников, полученных из иголок тиса ягодного (*Taxus Baccata*). Химически он состоит из таксанового кольца с 15 атомами углерода, связанного с оксиэтановым кольцом в положениях C4 и C5, тогда как в положении C13 присутствует сложноэфирная связь, которая считается необходимой для его противораковой активности.

Для преодоления указанных выше проблем, связанных с типом состава, были предприняты попытки, например, инкапсулировать указанное противораковое вещество в липосомы, нанокапсулы и микросферы, образованные полимерной оболочкой, образованной биоразлагаемыми сополимерами, такими как полимолочная кислота, или небiorазлагаемыми сополимерами, такими как сополимер этилена с винилацетатом, или микросферы, образованные полифосфоэфиром, нагруженным паклитакселом, для создания системы пролонгированного высвобождения лекарственного средства в месте лечения (Nuijen B. et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19:143-153).

Однако было показано, что эти новые системы для инкапсуляции паклитаксела имеют проблемы со стабильностью, производством и воспроизводимостью.

Более того, были предприняты различные попытки солюбилизовать вышеупомянутое лекарственное средство циклодекстринами, но новые препараты не давали желаемых результатов (Nuijen B. et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19:143-153).

Химические исследования новых препаратов паклитаксела, которые сделают это лекарственное средство более водорастворимым, сохраняя при этом его эффективность в качестве противоракового средства неизменной, привели в результате к синтезу новых аналогов, модифицированных в положениях C2' и C7, и, кроме того, к получению новых конъюгатов, также определяемых как пролекарства.

Имея это в виду, было предпринято несколько попыток синтезировать новые пролекарства, которые привели, например, к получению таких лекарственных средств, как ацетилпаклитаксел (Mellado W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 124(2):329-336), или к синтезу новых сложных эфиров вышеуказанного лекарственного средства с сукцинатом, глутаратом и сульфоновой кислотой на атоме углерода в положении C2', сложных эфиров, которые, однако, оказались нестабильными в водной среде.

Кроме того, также известно применение ПЭГ (полиэтиленгликоля) для дериватизации вышеуказанного химиотерапевтического вещества путем этерификации паклитаксела в положении C2'. Такая новая молекула оказалась хорошо растворимой в воде, но также имела ограниченную стабильность.

Наконец, была также разработана новая "система доставки" вышеуказанного лекарственного средства, которую получают путем конъюгации паклитаксела с белком сывороточного альбумина (ЧСА):

конъюгат паклитаксел-ЧСА оказался хорошо растворимым в воде, но нет достоверных данных об эффективности относительно паклитаксела *per se* (Nuijen B. et al., *Investigational. New Drugs*, 2001, 19:143-153).

Недавно была синтезирована новая система высвобождения паклитаксела, этерифицированного предварительно модифицированной гиалуроновой кислотой (ГК), т.е. дериватизированного молекулами гидразида, связанными с карбоксильной группой ГК амидной связью (Luo Y. et al., *Biomacromolecules*, 2000, 1(2):208-218) (US 5,874,417). Таким образом, была получена новая система доставки паклитаксела, которая позволяет лекарственному средству напрямую достигать поверхности мембраны опухолевой клетки-мишени, которая характеризуется сверхэкспрессией рецептора ГК CD44.

В попытке развить все возможности ассоциации паклитаксела с ГК, в результате был изучен и синтезирован новый конъюгат ГК с химиотерапевтическим веществом, причем ГК и химиотерапевтическое вещество ковалентно связаны в нем друг с другом опосредованно с помощью спейсера/линкера, такого как, например, броммасляная кислота, которая делает конечный продукт более водорастворимым и, следовательно, легким для введения (EP 2045270).

Объем настоящего изобретения заключается в определении нового способа получения и очистки, который является особенно эффективным и преодолевает отмеченные выше недостатки предшествующего уровня техники.

Подробное описание изобретения

Таким образом, объектом настоящего изобретения является оригинальный способ получения и очистки конъюгата гиалуроновой кислоты и паклитаксела (ГК-паклитаксела), который включает или состоит из следующих стадий:

а) активация в растворе паклитаксела в органическом растворителе, предпочтительно дихлорметане, содержащем спейсер/линкер 4-броммасляной кислоты, карбоксильной группы вышеуказанного спейсера/линкера 4-броммасляной кислоты с помощью активирующего агента, предпочтительно карбодиимида, более предпочтительно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC, CAS номер 25952-53-8), в присутствии катализатора, предпочтительно DMAP (4-диметиламинопиридина), с получением интермедиата конъюгата ГК и паклитаксела (Вг-С₄-паклитаксела);

б) кристаллизация интермедиата, полученного на предыдущей стадии (а), в органическом растворителе, предпочтительно N-гептане, затем его фильтрация и сушка;

с) добавление интермедиата, полученного на предыдущей стадии (б), к ТВА (тетрабутиламмониевой) соли ГК в ДМСО;

д) очистка полученного таким образом конъюгата ГК-паклитаксела, который имеет сложноэфирную связь между карбоксилем полисахарида ГК и спейсером/линкером, где указанный спейсер/линкер, в свою очередь, связан сложноэфирной связью через свой карбоксил с гидроксильной группой у атома углерода в положении С2' паклитаксела, путем осаждения с помощью раствора этанол/вода, содержащего соль NaBr, по меньшей мере одной последующей промывки в этаноле/воде и дополнительной промывки в этаноле, предварительная сушка при температуре 40°C и пропускание в насыщенной водяным паром камере при температуре 40°C и атмосферном давлении, наконец, сушка при температуре 40°C под вакуумом.

Еще одним объектом изобретения является конъюгат ГК-паклитаксела, имеющий степень дериватизации или этерификации в диапазоне от 15 до 21% (мас./мас.), предпочтительно в диапазоне от 16 до 20% (мас./мас.), где исходная гиалуроновая кислота имеет ферментативное происхождение и среднюю молекулярную массу от 140000 до 250000 Да, причем указанный конъюгат имеет форму мелкодисперсного и однородного порошка со степенью чистоты более 98% (мас.) в пересчете на сухой продукт и содержит количество ди-Вг-паклитаксела менее 1% (мас.).

Еще одним объектом изобретения также является конъюгат ГК-паклитаксела в форме мелкодисперсного и однородного порошка, содержащего менее 1% (мас.) ди-Вг-паклитаксела, полученный и очищенный, как описано, и, следовательно, чрезвычайно чистый по отношению к такому же конъюгату, полученному способом согласно EP 2045270.

Еще одним объектом изобретения также является фармацевтическая композиция, по существу состоящая из конъюгата, полученного и очищенного с помощью описанного выше способа, в сочетании с фармакологически приемлемыми разбавителями/эксципиентами, предпочтительно фармацевтическая композиция, приготовленная в стерильной изотонической воде, содержащей 5% (мас./об.) глюкозы, для применения в лечении распространенного рака молочной железы, рака легких, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы и эндометрия и мезотелиомы.

Композицию по настоящему изобретению применяют при лечении всех форм рака, при которых обычно применимы паклитаксел, все известные вышеперечисленные производные такого лекарственного средства и таксаны в целом.

Таким образом, в настоящем изобретении описано и заявлено получение и очистка конъюгата ГК-паклитаксела согласно оригинальному способу синтеза, состоящему во введении спейсера/линкера между гиалуроновой кислотой и вышеуказанным химиотерапевтическим веществом посредством образования сложноэфирной связи между карбоксилем вышеуказанного полисахарида и спейсером/линкером, причем указанный спейсер/линкер, в свою очередь, связан (всегда сложноэфирной свя-

зью) через свой карбоксил с гидроксильной группой у атома углерода C2' паклитаксела, при этом спейсер/линкер, используемый для синтеза вышеуказанного конъюгата, представляет собой 4-броммасляную кислоту.

Такой новый способ синтеза конъюгата ГК-паклитаксела отличается от EP 2045270, поскольку он обеспечивает:

- образование конъюгата с большей степенью чистоты;
- исключение заключительного диализа;
- сокращение использования растворителей;
- получение исходного материала (конъюгата ГК-паклитаксела) в виде мелкодисперсного и однородного порошка, легко поддающегося стерилизации путем фильтрации после приготовления в водном растворителе;
- сокращение времени синтеза.

Полученный и очищенный таким образом конъюгат ГК-паклитаксела имел степень дериватизации в диапазоне от 15 до 21% (мас./мас.), предпочтительно в диапазоне от 16 до 20% (мас./мас.).

Степень дериватизации или этерификации вышеуказанного конъюгата определяют ниже как массовую процентную долю паклитаксела к массе ГК-паклитаксела, таким образом, 100 мг конъюгата со степенью дериватизации, составляющей от 15 до 21% (мас./мас.), будут содержать 15, 16, 17, 18, 19, или 20, или 21 мг химиотерапевтического вещества паклитаксел в зависимости от указанной степени дериватизации (чтобы дополнительно проиллюстрировать это, при степени дериватизации 20% (мас./мас.) в 100 мг конъюгата содержится 20 мг паклитаксела); однако специалисту в данной области техники очевидно, что в конце таких промышленных способов синтеза может происходить небольшое варьирование в соотношении массы между молекулами, поэтому здесь и далее заявитель, описывая и заявляя диапазон дериватизации вышеуказанного конъюгата, составляющий от 15 до 21% (мас./мас.), намерен заявлять все заявленные процентные значения, включающие $\pm 1\%$: например, степень 20% (мас./мас.) соответственно полагают равной $20 \pm 1\%$.

ГК, используемая для синтеза такого конъюгата ГК-паклитаксела, может быть получена из любого источника, например, путем экстракции из петушиных гребней (например, согласно EP 0138572 или WO 2018/020458), или биотехнологическим путем (например, согласно EP 2614088 или EP 2614087), или предпочтительно ферментативным путем (например, согласно EP0716688) и иметь среднемассовую молекулярную массу (MW) в диапазоне от 400 до 3×10^6 Да, предпочтительно от 400 до 1×10^6 Да, еще более предпочтительно от 140000 до 250000 Да (среднемассовая молекулярная масса означает массу, вычисленную с помощью способа "характеристической вязкости" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377)). ГК-паклитаксел, описанный и заявленный заявителем, имеет степень дериватизации в пределах от 15 до 21% (мас./мас.), предпочтительно в пределах от 16 до 20% (мас./мас.), предпочтительно получен из ГК ферментативного происхождения со среднемассовой молекулярной массой в диапазоне от 140000 до 250000 Да.

Конъюгат ГК-паклитаксела, описанный выше, получают и очищают в соответствии с вышеуказанным оригинальным способом синтеза, модифицированным по сравнению с предшествующим уровнем техники и, таким образом, подробно описанным ниже:

в растворе паклитаксела в органическом растворителе, предпочтительно дихлорметане, содержится спейсер/линкер 4-броммасляной кислоты, карбоксильную группу 4-броммасляной кислоты активируют активирующим агентом, таким как карбодимид, предпочтительно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид (EDC), в присутствии катализатора, предпочтительно DMAP (4-диметиламинопиридина), таким образом получают образование сложного эфира между гидроксильной функциональной группой при атоме углерода C2' паклитаксела и карбоксильной группой спейсера/линкера для образования интермедиата конъюгата ГК-паклитаксела, в котором связь между указанным спейсером/линкером и паклитакселом представляет собой сложноэфирную связь;

полученный интермедиат кристаллизуют путем добавления органического растворителя, предпочтительно N-гептана, к вышеуказанному раствору, затем выделяют путем фильтрации и сушат; таким образом получают высушенный интермедиат, который затем анализируют для оценки степени чистоты с помощью метода ВЭЖХ на наличие ди-Вг-паклитаксела, количество которого благодаря вышеуказанной стадии кристаллизации резко снижается, оказываясь менее 1% (мас.), следовательно, чистота продукта такого синтеза оказывается более 98% (мас./мас.);

затем путем прямого контакта указанного интермедиата с ТВА (тетрабутиламмониевой) солью ГК в диметисульфоксиде (ДМСО) (ДМСО позволяет растворять такой интермедиат и оптимизирует реакцию указанного синтеза по сравнению с N-метил-2-пирролидоном (NMP) и диметилформамидом (DMF)) получают нуклеофильное замещение COO- ГК на углероде, связанном с бромом спейсера/линкера. Таким образом, образуется сложноэфирная связь между ГК и спейсером/линкером, ранее связанным и паклитаксела;

полученный конъюгат таким образом очищают путем осаждения из раствора этанол/вода, содержащего NaBr (при температуре 40°C), затем промывают один или более раз в этаноле/воде и потом про-

мывают в этаноле, затем предварительно сушат при температуре 40°C, оставляют при температуре 40°C в насыщенной водяным паром камере при атмосферном давлении и, наконец, сушат при температуре 40°C под вакуумом.

Заявитель неожиданно обнаружил, что NaBr облегчает осаждение конъюгата и, следовательно, его очистку, в то же время NaBr, в свою очередь, легко удаляется путем последующих промывок конъюгата указанными выше водно-спиртовыми растворами.

Стадии предварительной сушки и пропускание в насыщенной водяным паром камере при атмосферном давлении проводят при температуре 40°C в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 8 ч, а стадию сушки проводят при температуре 40°C, под вакуумом, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 16 ч.

Такая стадия очистки конъюгата исключает процесс диализа.

Полученный конечный продукт представляет собой мелкодисперсный и однородный порошок, его анализируют методом ВЭЖХ для оценки степени дериватизации или этерификации карбоксила, и его способности фильтроваться.

Таким образом, показано, что конъюгат ГК-паклитаксела, полученный и очищенный, как указано выше, свободен от загрязняющих веществ, в основном представленных следующими:

ди-Br-паклитаксел: полностью нежелательный побочный продукт реакции вследствие реакции этерификации двух молекул 4-броммасляной кислоты с молекулой паклитаксела по двух разным гидроксилам. Снижение содержания этого вторичного продукта является значительным улучшением процесса синтеза и очистки конъюгата, поскольку ди-Br-паклитаксел взаимодействует с двумя карбоксильными функциональными группами одной или двух молекул ГК-ТВА и, следовательно, определяет образование сшитой фармацевтической композиции, содержащей конъюгат согласно настоящему изобретению, которая полностью теряет терапевтическую эффективность и ставит под сомнение возможность стерилизации путем фильтрации с помощью 0,2 мкм фильтров;

остатки NaBr, растворителей и активирующих агентов, которые удаляются благодаря стадии кристаллизации интермедиата в N-гептане, благодаря стадии осаждения в этаноле и последующим промывкам конечного продукта ГК-паклитаксела в водно-спиртовом растворе. На практике, можно проводить процесс кристаллизации в N-гептане, и, следовательно, он включает только интермедиат, что, таким образом, приводит к чистому продукту, который легко отделить от остатков различного вида, присутствующих в реакционной среде.

Благодаря всем вышеперечисленным стадиям получают чрезвычайно чистый мелкодисперсный порошкообразный конъюгат без необходимости проведения заключительного диализа, что также определяет значительную экономию растворителей.

Таким образом, способ синтеза и очистки конъюгата ГК-паклитаксела, являющийся объектом изобретения, отличается от EP 2045270, поскольку он обеспечивает:

образование конъюгата с большей степенью чистоты;

исключение заключительного диализа;

сокращение использования растворителей;

получение исходного материала в виде мелкодисперсного и однородного порошка, легко поддающегося стерилизации путем фильтрации после приготовления в водном растворителе;

общее сокращение времени синтеза.

Чтобы лучше проиллюстрировать объем и преимущества настоящего изобретения, приведен пример получения и очистки конъюгата ГК-паклитаксела, который, однако, никоим образом не ограничивает объем формулы изобретения.

Пример 1. Получение и очистка конъюгата ГК-паклитаксела со степенью дериватизации 18% (мас./мас.).

Получение сложноэфирного производного ГК (ГК, используемая для такого синтеза, имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 16000 до 23000 Да) и паклитаксела, имеющего степень дериватизации, т.е. этерификации карбоксила, 18% (мас./мас.).

110,1 мг 4-броммасляной кислоты, 151,9 мг EDC и 19,5 мг DMAP добавляли в 308,7 мг паклитаксела, растворенного в 15 мл дихлорметана, при перемешивании при температуре 10°C в течение по меньшей мере 40 мин. Затем к полученному таким образом раствору добавляли воду; после перемешивания в течение нескольких минут органической фазе давали отделиться. Органическую фазу собирали, а водную фазу (содержащую соли и остаток бромида) удаляли. К полученной таким образом органической фазе добавляли 25 мл N-гептана при температуре 10°C, получая кристаллизацию интермедиата, затем выделяли путем фильтрации и таким образом сушили. Таким образом, было получено 301 мг высушенного продукта-интермедиата.

300 мг такого интермедиата было добавлено в раствор 1000 мг ГК-ТВА (соли ГК с тетрабутиламмонием), растворенной в 44 мл ДМСО. Через 1 день реакции при температуре 40°C в раствор добавляли 50 мл ДМСО. Через 1 ч медленно по каплям добавляли раствор этанол/вода в соотношении 96/4, содержащий NaBr с концентрацией 2% (мас./мас.), получая таким образом осадок полученного конъюгата, который многократно промывали в этаноле/воде (8,5/1,5), окончательно повторно промывали 100% эта-

нолом и затем предварительно сушили при температуре 40°C в течение 8 ч. Предварительно высушенный продукт затем оставляли при 40°C в насыщенной водяным паром камере при атмосферном давлении еще на 8 ч и, наконец, сушили при 40°C в вакууме не менее 16 ч, но до полного высыхания.

Полученный конъюгат ГК-паклитаксела анализировали методом ВЭЖХ (Rosato A., *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2006, 24:207-215), чтобы проверить, что эффективная степень дериватизации составила 18% (мас./мас.); методом ВЭЖХ высушенного интермедиата (Theodoridis G. et al., *Application Note*, August 1999:40-44) определили количество ди-Вг-паклитаксела, которое составило менее 1% (мас.) (как продемонстрировано ниже), степень чистоты конъюгата составила более 98% (мас.) в пересчете на сухой продукт.

Конъюгат ГК-паклитаксела, полученный как описано выше, представляет собой бело-желтоватый порошок, однородный и гигроскопичный, легко стерилизуемый путем фильтрации с помощью 0,2 мкм фильтров при восстановлении в водной среде в виде фармацевтической композиции.

Пример 2 сравнительный. Получение и очистка конъюгата ГК-паклитаксела согласно WO 2004/035629 (EP 2045270).

Получение сложноефирного производного ГК и паклитаксела со степенью этерификации карбоксила 18% (мас./мас.).

Чтобы продемонстрировать, что способ, являющийся объектом изобретения, превосходит предшествующий уровень техники, представленный способом, описанным в WO 2004/035629, заявитель приготовил конъюгат ГК-паклитаксела в соответствии с примером 6 из WO 2004/035629, изменив массовую концентрацию различных компонентов, для получения конъюгата ГК-паклитаксела со степенью этерификации карбоксила 18% (мас./мас.), чтобы сравнить такое производное в отношении чистоты и способности фильтроваться с конъюгатом ГК-паклитаксела из примера 1 данного документа.

Используемая ГК имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 160000 до 230000 Да, как в примере 1.

Вкратце, к 308,7 мг паклитаксела, растворенного в 15 мл дихлорметана, добавляли 117,2 мг 4-броммасляной кислоты и 614,1 мг EDC. Затем в раствор добавляли воду для удаления всего бромида и карбодиимида. В полученный таким образом органический раствор добавляли сульфат натрия для обезвоживания, а растворитель удаляли с помощью роторного испарителя. В итоге, было получено 363 мг высушенного интермедиата.

315 мг полученного таким образом интермедиата добавляли к ГК-ТВА, растворенного в безводном NMP, раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 7 дней, после чего добавляли 20 мл бидистиллированной воды и 4 мл насыщенного раствора NaCl. Его перемешивали в течение 1 ч, чтобы обеспечить обмен натрия с ионом ТВА. Затем по каплям добавляли этанол и полученный таким образом волокнистый продукт растворяли в воде, подвергали диализу и, наконец, лиофилизировали.

Конъюгат ГК-паклитаксела, полученный в соответствии с примером 2, анализировали методом ВЭЖХ, чтобы проверить, что полученная эффективная степень дериватизации составила 18% (мас./мас.).

Таким образом, два конъюгата из примеров 1 и 2 сравнивали для проверки их чистоты в отношении количества ди-Вг-паклитаксела (сшитого побочного продукта реакции), присутствующего и определяемого в высушенном интермедиате из примеров 1 и 2 (методом ВЭЖХ в отношении высушенного интермедиата, Theodoridis G. et al., *Application Note*, August 1999:40-44), и способности фильтроваться через фильтры из ацетата целлюлозы (Minisart®, 0,2 мкм), которые гарантируют квалифицированному специалисту стерильность продукта, измеренную при давлении 2 атм.

Испытание на способность фильтроваться.

Для проведения испытания использовали небольшой стальной бак (Sartorius Stedim объемом 0,22 л) с входным отверстием для сжатого воздуха (регулируемым манометром) в верхней части и выходным отверстием в нижней части. В бак загружали 15 мл раствора ГК-паклитаксела, растворенного до концентрации 12 мг/мл в глюкозе концентрацией 5% (мас./мас.). Под баком, на выходном отверстии, установлен фильтр 0,2 мкм (Minisart, CE, Sterile). Поток сжатого воздуха регулировали для получения давления около 1,5 бар внутри стального бака с целью проталкивания раствора через стерильный фильтр. В момент начала фильтрации включали хронометр и, поместив градуированный цилиндр под выходное отверстие фильтра, измеряли отфильтрованный объем с течением времени.

Результаты.

Конъюгат ГК-паклитаксела, полученный согласно примеру 1:

ди-Вг-паклитаксел (мас./мас.) (процентная массовая доля относительно массы интермедиата): 0,8%; способность фильтроваться (раствор 12 мг/мл конъюгата в растворе глюкозы концентрацией 5% (мас./мас.)): 4,5 мл/мин.

Конъюгат ГК-паклитаксела, полученный согласно примеру 2:

ди-Вг-паклитаксел (мас./мас.): 5,2%; способность фильтроваться: 0,04 мл/мин.

В заключение, полученные результаты показывают, что конъюгированный ГК-паклитаксел, полученный согласно способу изобретения, отличается:

очень высокой степенью чистоты при совершенно незначительном количестве ди-Вг-паклитаксела;

высокой способностью отфильтровываться через 0,2 мкм фильтры, которые, как известно специалисту в данной области, обеспечивают стерильность фильтрата (фильтрующая способность 0,04 мл/мин является признаком мало/плохо фильтруемого продукта, поэтому не поддается стерилизации через фильтры 0,2 мкм, что делает необходимым выбор альтернативного метода стерилизации, такого как термическая или радиационная стерилизация, причем оба метода, однако, определяют, как широко известно, частичное разрушение продуктов, подвергнутых таким процессам, особенно производных сложных эфиров).

Наконец, способ по изобретению приводит к значительному снижению количества используемого растворителя, поскольку в таком способе не проводится очистка путем диализа конъюгата, запланированная, однако, в известном специалисту способе, что приводит к значительному сокращению времени приготовления конъюгата по примеру 1-2 в сравнении.

Таким образом, полученный конъюгат имел оптимальные характеристики по сравнению с конъюгатом, полученным в предшествующем уровне техники (WO 2004/035629), и, кроме того, обеспечивалась значительная экономия издержек и времени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения и очистки конъюгата гиалуроновой кислоты и паклитаксела (ГК-паклитаксела), который включает или состоит из следующих стадий:

а) активация в растворе паклитаксела в органическом растворителе, содержащем спейсер/линкер 4-броммасляной кислоты, карбоксильной группы вышеуказанного спейсера/линкера 4-броммасляной кислоты с помощью активирующего агента, представляющего собой карбодиимид, в присутствии катализатора с получением интермедиата конъюгата ГК-паклитаксела;

б) кристаллизация интермедиата, полученного на предыдущей стадии (а), в органическом растворителе, затем его фильтрация и сушка;

с) добавление интермедиата, полученного на предыдущей стадии (б), к ТВА (тетрабутиламмониевой) соли ГК в ДМСО;

д) очистка конъюгата ГК-паклитаксела, полученного таким образом, который имеет сложноэфирную связь между карбоксилем полисахарида ГК и спейсером/линкером, где указанный спейсер/линкер, в свою очередь, связан посредством сложноэфирной связи через свой карбоксил с гидроксильной группой у атома С2' углерода паклитаксела, путем осаждения в растворе этанол/вода, содержащем соль NaBr, по меньшей мере одной последующей промывки в этаноле/воде и дальнейшей промывки в этаноле, предварительная сушка при температуре 40°C и пропускание в насыщенной водяным паром камере при температуре 40°C и атмосферном давлении, наконец, сушка при температуре 40°C под вакуумом.

2. Способ по п.1, в котором на стадии (а) активации активирующий агент представляет собой 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC).

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на стадии (а) активации катализатор представляет собой 4-диметиламинопиридин (DMAP).

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на стадии (б) кристаллизации растворитель представляет собой N-гептан.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на стадии (д) очистки предварительную сушку и пропускание в насыщенной водяным паром камере при атмосферном давлении проводят при температуре 40°C в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 8 ч, а стадию сушки проводят при температуре 40°C, под вакуумом, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 16 ч.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором исходная гиалуроновая кислота имеет среднемассовую молекулярную массу в диапазоне от 400 до 3×10^6 Да.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором исходная гиалуроновая кислота получена путем экстракции из петушиных гребней, биотехнологическим или ферментативным путем, предпочтительно ферментативным.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на стадии (а) активации органический растворитель представляет собой дихлорметан.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором исходная гиалуроновая кислота имеет среднемассовую молекулярную массу в диапазоне от 400 до 1×10^6 Да.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором исходная гиалуроновая кислота имеет среднемассовую молекулярную массу в диапазоне от 140000 до 250000 Да.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором исходная гиалуроновая кислота получена ферментативным путем и имеет среднемассовую молекулярную массу в диапазоне от 140000 до 250000 Да.

