

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 046205

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.02.15

(51) Int. Cl. A61K 31/337 (2006.01)  
A61K 31/395 (2006.01)  
A61K 31/537 (2006.01)

(21) Номер заявки  
202092369

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.10

---

(54) КОНЬЮГАТЫ ФОСФОЛИПИД-ФЛАВАГЛИН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА

---

(31) 62/655,659

(56) US-A1-20170356914  
US-B2-8022235  
US-A1-20160228564

(32) 2018.04.10

(33) US

(43) 2021.01.26

(86) PCT/US2019/026853

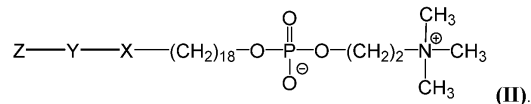
(87) WO 2019/200017 2019.10.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
СЕЛЛЕКТАР БАЙОСАЙЕНСИЗ,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Лонгкор Джеррод (US)

(74) Представитель:  
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Христофоров А.А.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова  
М.Ю., Лебедев В.В., Пармонова К.В.  
(RU)

(57) Изобретение относится к конъюгату фосфолипид-флаваглин, который имеет формулу II и включает в себя фосфолипидный эфир (PLE), конъюгированный с флаваглином через линкер:



Дополнительно раскрываются способы лечения рака у субъекта и способы нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта.

B1

046205

046205

B1

### Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/655659, поданной 10 апреля 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

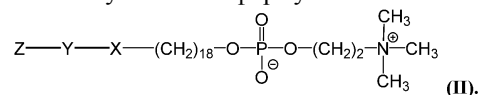
Настоящее изобретение относится к конъюгатам фосфолипид-флаваглин и методам целенаправленной терапии рака.

### Введение

Эффективность большинства противораковых лекарственных средств при применении в клинических условиях ограничена их токсичностью для всех пролиферирующих клеток и/или неспособностью оказывать свое воздействие на все из опухолевых клеток. Продолжается разработка новых средств с уникальными механизмами действия, направленными на обеспечение улучшенного нацеливания, тем не менее, многим из этих соединений все еще недостает абсолютной селективности в отношении опухоли, и это приводит к ограничению их терапевтического применения вследствие нецелевых эффектов. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) были сконструированы для связывания со специфическими эпитопами на поверхности опухолевых клеток, и они предложили альтернативный способ для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки с целью снижения ассоциированных токсичностей. Несмотря на то что они имеют высокую селективность, очень небольшое количество конъюгатов антитело-лекарственное средство являются терапевтически полезными, поскольку они достигают умеренного поглощения клетками и ограниченной цитолитической активности. Требуется более эффективные платформы для целенаправленного воздействия на опухоли.

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Изобретение относится к конъюгату согласно формуле II или его соли



Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрена композиция, содержащая конъюгат, который подробно описан в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрен способ лечения рака у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту конъюгата, который подробно описан в данном документе. Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрен способ нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту конъюгата, который подробно описан в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флаваглиновое противораковое лекарственное средство локализуется или перемещается в цитоплазму или органеллу опухолевой или раковой клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство являются селективными в отношении раковых клеток у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство включаются по меньшей мере приблизительно в 2-кратное большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак является выбранным из меланомы, рака головного мозга, рака легкого, рака надпочечника, рака печени, рака почки, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, рака предстательной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака шейки матки, лимфомы, лейкоза, миеломы, гемобластоза, гепатоцеллюлярной карциномы, ретинобластомы, глиомы, саркомы, бластомы, плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой человека.

Настоящим раскрытием предусмотрены другие аспекты и варианты осуществления, которые будут очевидны с учетом следующего подробного описания и приложенных фигур.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1A, 1B, 1C, 1D, 1E представляют собой изображения опухолевых клеток с отмеченными липидными рафтами. Опухолевые клетки характеризуются большей концентрацией липидных рафтов по сравнению с нормальными клетками. Фиг. 1F представляет собой изображение нормальных фибробластов и опухолевых клеток Saki-2 с использованием CLR 1501 (соединение (1)). CLR 1501 на высоком уровне локализовался в клетках Saki-2 и на минимальном уровне - в нормальных фибробластах. Фиг. 1G представляет собой изображение контрольных клеток A549, и фиг. 1H представляет собой изображение клеток A549, обработанных метил-бета-циклодекстрином для разрушения липидных рафтов. Клетки как на фиг. 1G, так и на фиг. 1H инкубировали с CLR 1501 (соединение (1)), и разрушение большинства липидных рафтов в клетках A549 приводило в результате к 60% снижению поглощения CLR 1501 (соединение (1)). Фиг. 1I, 1J и 1K представляют собой изображения клеток PC3, инкубируемых с CLR 1501 (соединение (1)) и окрашенных для визуализации эндоплазматического ретикулула (ER). CLR 1501 (соединение (1)) локализовалось в ER в злокачественных клетках, а не в нормальных клетках (не показано).

Фиг. 1L, 1M и 1N представляют собой изображения клеток РС3, инкубируемых с CLR 1501 (соединение (1)) и окрашенных для визуализации ядра и митохондрий. CLR 1501 (соединение (1)) локализовалось в митохондриях.

Фиг. 2 представляет собой изображение несущей опухоль ободочной и прямой кишки (HCT-116) мыши, которой вводили инъекцией CLR 1502 (соединение (2)), демонстрирующее локализацию опухоли.

На фиг. 3 представлен график зависимости цитотоксичности от концентрации для цитотоксичного соединения (FLV1) по сравнению с цитотоксическим соединением, конъюгированным с PLE (CLR 1865, соединение (8)), в клетках A549 (аденокарцинома легкого человека) или нормальных фибробластах кожи человека (NHDF).

На фиг. 4 представлен график зависимости кратности повышения от времени для поглощения PLE-конъюгата CLR 1852 (соединение (9)) в клетках A375 (меланома человека) и HEK293 (эмбриональная почка человека).

На фиг. 5 представлены изображения модели рака молочной железы у мышей, демонстрирующие поглощение CLR 1502 (соединение (2)) *in vivo*.

На фиг. 6 представлены изображения клеточных линий миеломы, демонстрирующие поглощение CLR 1501 (соединение (1)).

На фиг. 7 представлены изображения раковых стволовых клеток, нормальной ткани головного мозга и нормальных стволовых клеток, демонстрирующие специфическое поглощение CLR 1501 (соединение (1)) в раковые клетки.

На фиг. 8 представлен график зависимости выраженной в процентах цитотоксичности от концентрации для CLR 1852 (соединение (9)) по сравнению с FLV3 в клетках A549 (аденокарцинома легкого человека) и нормальных фибробластах кожи человека (NHDF).

На фиг. 9 представлен график зависимости объема от времени для среды по сравнению с CLR 1852 (соединение (9)) в модели опухоли HCT 116.

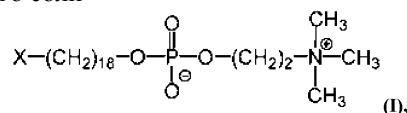
На фиг. 10 представлен график зависимости массы тела от времени для среды по сравнению с CLR 1852 (соединение (9)) в модели опухоли HCT 116.

На фиг. 11 представлен график зависимости концентрации от времени для FLV3, выявленного в цитозоле (нормализованной к объему цитозоля) в линиях клеток A375 (меланома человека) и A549 (аденокарцинома легкого человека).

#### Подробное раскрытие настоящего изобретения

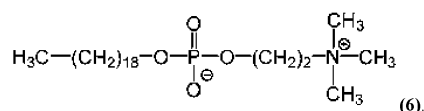
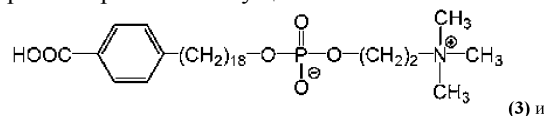
В данном документе описаны фосфолипидные соединения и конъюгаты фосфолипид-флаваглин. Исходя из того, что многие опухоли животных и человека содержат более высокие концентрации встречающихся в естественных условиях эфирных липидов, чем в нормальных тканях, были разработаны молекулы эфира фосфолипида (PLE). Молекулы PLE, подробно описанные в данном документе, можно применять в качестве платформы для нацеливания на опухоль для селективной доставки лекарственных средств к опухолям и раковым клеткам.

В соответствии с одним аспектом настоящего раскрытия относится к эфиру фосфолипида (PLE) в соответствии с формулой I или к его соли



причем X представляет собой водород, метил или фенил, замещенный карбоксилком.

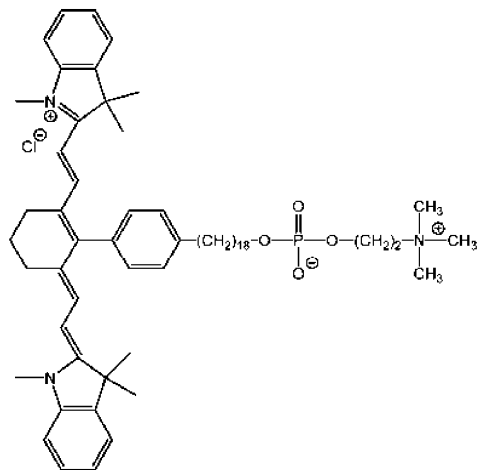
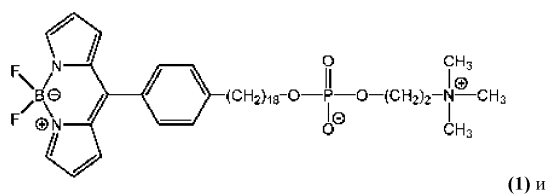
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PLE является выбранным из следующего



В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PLE дополнительно включает в себя выявляемый фрагмент, прикрепленный к нему.

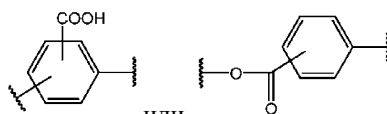
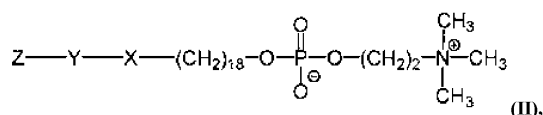
В соответствии с дополнительным аспектом настоящего раскрытия относится к композиции, содержащей PLE, который подробно описан в данном документе, и носитель.

Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрено соединение, выбранное из следующего



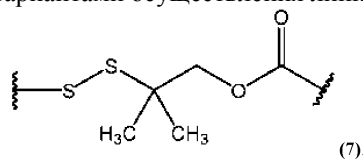
Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрена композиция, содержащая по меньшей мере одно из этих соединений и носитель.

Еще одним аспектом настоящего раскрытия предусмотрен конъюгат, соответствующий формуле II, или его соль

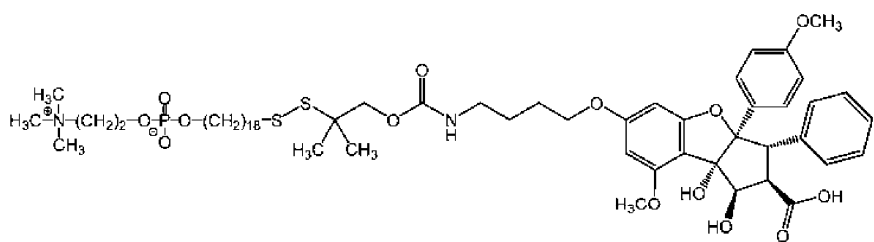


причем X представляет собой или или метилен, или связь; Y представляет собой линкер, содержащий дисульфид; и Z представляет собой флаваглиновое противораковое лекарственное средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флаваглиновое противораковое лекарственное средство содержит FLV-1, FLV-3, его производное или аналог или их комбинацию.

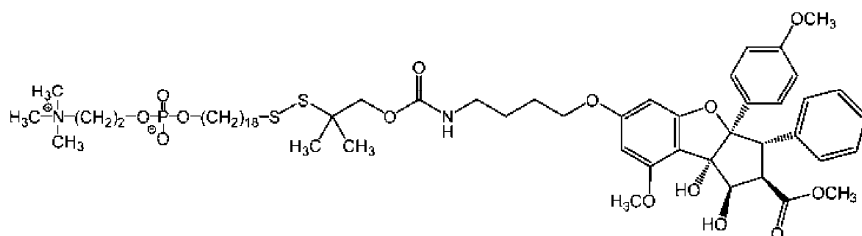
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит следующее



В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгат является выбранным из следующего



(8) и



(9).

Как подробно описано в данном документе, распространение молекул PLE в тканях оценивали в клетках более чем 100 различных опухолей, в том числе в свежих образцах опухолей человека. Молекулы PLE демонстрировали повышенное поглощение в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью. Молекулы PLE можно конъюгировать с молекулами флаваглина и их производными через линкеры с образованием конъюгатов фосфолипид-флаваглин.

#### 1. Определения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно квалифицированному специалисту в данной области техники. В случае конфликта преимущественную силу будет иметь данный документ, в том числе определения. Ниже описаны предпочтительные способы и материалы, тем не менее, способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или проверке настоящего изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными, и не предполагается, что они являются ограничивающими. Предполагается, что термины "содержат" ("содержит"), "включают в себя" ("включает в себя"), "имеющий", "имеет", "могут", "содержат" ("содержит") и их варианты, используемые в контексте данного документа, представляют собой открытые переходные фразы, термины или слова, которые не исключают возможность дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают в себя соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Настоящим раскрытием также предусмотрены другие варианты осуществления, "содержащие", "состоящие из" и "состоящие, по существу, из" вариантов осуществления или элементов, представленных в данном документе, вне зависимости от того, изложены ли они в явном виде или нет.

В случае перечисления в данном документе числовых диапазонов специально предусмотрено каждое промежуточное число в них при такой же степени точности. Например, в случае диапазона 6-9 числа 7 и 8 предусмотрены дополнительно к 6 и 9, а в случае диапазона 6,0-7,0 специально предусмотрены 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Термин "приблизительно", используемый в контексте данного документа применительно к одному или нескольким значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое является подобным изложенному заданному значению. В соответствии с определенными аспектами термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) относительно изложенного заданного значения, если не указано иное, или если иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Определения конкретных функциональных групп и химические термины более подробно описаны ниже. В рамках настоящего раскрытия химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей элементов, версией CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed., внутренняя сторона обложки, и конкретные функциональные группы обычно определены, как описано в этих источниках. Кроме того, общие принципы органической химии, а также конкретные функциональные фрагменты и реакционная способность описаны в Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 7<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2013; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989;

Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987; причем полное содержание каждого из этих источников включено в данный документ посредством ссылки.

Термины "алкокси" или "алкоксил", используемые в контексте данного документа, относятся к алкильной группе, которая определена в данном документе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода. Типичные примеры алкокси включают в себя, без ограничения, метокси, этокси, пропокси, 2-пропокси, бутокси и трет-бутокси.

Термин "алкил", используемый в контексте данного документа, означает линейную или разветвленную насыщенную углеводородную цепь, содержащую от 1 до 20 атомов углерода. Термины "низший алкил" или "C<sub>1-6</sub>алкил" означают углеводород с линейной или разветвленной насыщенной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Термин "C<sub>1-4</sub>алкил" означает углеводород с линейной или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 4 атомов углерода. Термин "C<sub>1-3</sub>алкил" означает углеводород с линейной или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 3 атомов углерода. Типичные примеры алкила включают в себя, без ограничения, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, 3-метилгексил, 2,2-диметилпентил, 2,3-диметилпентил, н-гептил, н-октил, н-нонил и н-децил. Термин "алкенил", используемый в контексте данного документа, означает ненасыщенную углеводородную цепь, содержащую от 2 до 20 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Термин "алкинил", используемый в контексте данного документа, означает ненасыщенную углеводородную цепь, содержащую от 2 до 20 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь.

Термин "алкоксиалкил", используемый в контексте данного документа, относится к алкокси группе, которая определена в данном документе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе.

Термин "арилалкил", используемый в контексте данного документа, относится к арильной группе, которая определена в данном документе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе.

Термин "алкиламино", используемый в контексте данного документа, означает по меньшей мере одну алкильную группу, которая определена в данном документе, присоединенную к исходному молекулярному фрагменту через аминогруппу, которая определена в данном документе.

Термин "алкилен", используемый в контексте данного документа, относится к двухвалентной группе, полученной из углеводорода с линейной или разветвленной цепью с 1-10 атомами углерода, например, с 2-5 атомами углерода. Типичные примеры алкилена включают в себя, без ограничения, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

Термин "амид", используемый в контексте данного документа, означает -C(O)NR- или -NRC(O)-, причем R может представлять собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероцикл, алкенил или гетероалкил.

Термин "аминоалкил", используемый в контексте данного документа, означает по меньшей мере одну аминогруппу, которая определена в данном документе, присоединенную к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе.

Термин "амино", используемый в контексте данного документа, означает -NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, причем R<sub>x</sub> и R<sub>y</sub> может представлять собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероцикл, алкенил или гетероалкил. В случае аминоалкильной группы или любого другого фрагмента, в котором амино соединяет вместе два других фрагмента, амино может представлять собой -NR<sub>x</sub>-, в котором R<sub>x</sub> может представлять собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероцикл, алкенил или гетероалкил.

Термин "арил", используемый в контексте данного документа, относится к ароматической группе, такой как фенильная группа, или к бициклической конденсированной кольцевой системе. Примером бициклических конденсированных кольцевых систем является фенильная группа, прикрепленная к исходному молекулярному фрагменту и конденсированную с циклоалкильной группой, которая определена в данном документе, фенильная группа, гетероарильная группа, которая определена в данном документе, или гетероцикл, который определен в данном документе. Типичные примеры арила включают в себя, без ограничения, индолил, нафтил, фенил, хинолинил и тетрагидрохинолинил. Термин "арилалкил" относится к алкилу, который определен в данном документе, замещенному арильным радикалом.

"Арилен" относится к арилу, который определен в данном документе, имеющему два одновалентных радикальных центра, полученных посредством удаления двух атомов водорода с двух атомов углерода в исходном ариле. Типичные ариленовые радикалы включают в себя, без ограничения, фенилен и нафтилен. "Арилалкилен" относится к арилалкилу, который определен в данном документе, имеющему два одновалентных радикальных центра, полученных посредством удаления одного атома водорода с арильного радикала, а другой атом водорода удален с алкильного радикала группы.

Термин "карбоксил", используемый в контексте данного документа, означает карбоновую кислоту или -COOH.

Термин "циклоалкил" означает одновалентное насыщенное углеводородное кольцо или бицикличе-

скую группу. Циклоалкильные группы имеют ноль гетероатомов и ноль двойных связей. Циклоалкильные группы являются моноциклическими или представляют собой конденсированные, спиро- или мостиковые бициклические кольцевые системы. Моноциклические циклоалкильные группы содержат 3-10 атомов углерода, предпочтительно, 4-7 атомов углерода и, более предпочтительно, 5-6 атомов углерода в кольце. Бициклические циклоалкильные группы содержат 8-12 атомов углерода, предпочтительно, 9-10 атомов углерода в кольце. Циклоалкильные группы могут быть насыщенными или ненасыщенными. Циклоалкильные группы включают в себя, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил. Термин "циклоалкенил", используемый в контексте данного документа, означает неароматическую моноциклическую или полициклическую кольцевую систему, содержащую по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь и, предпочтительно, имеющую от 5-10 атомов углерода на кольцо. Иллюстративные моноциклические циклоалкенильные кольца включают в себя циклопентенил, циклогексенил и циклогептенил.

Термин "циклоалкинил", используемый в контексте данного документа, означает моноциклическую или полициклическую кольцевую систему, содержащую по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь и, предпочтительно, имеющую от 5-10 атомов углерода на кольцо или более 10 атомов углерода на кольцо. Термин "галогеналкил", используемый в контексте данного документа, означает алкильную группу, определенную в данном документе, в которой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь атомов водорода заменены галогеном. Типичные примеры галогеналкила включают в себя, без ограничения, 2-фторэтил, 2,2,2-трифторэтил, трифторметил, дифторметил, пентафторэтил и трифторпропил, такой как 3,3,3-трифторпропил.

Термины "галоген" или "галогенид", используемые в контексте данного документа, означают Cl, Br, I или F.

Термин "гетероалкил", используемый в контексте данного документа, означает алкильную группу, определенную в данном документе, в которой по меньшей мере один из углеродов в алкильной группе заменен на гетероатом, такой как кислород, азот и серу. Типичные примеры гетероалкилов включают в себя, без ограничения, эфиры алкила, вторичные и третичные алкиламины, амиды и алкилсульфиды.

Термин "гетероарил", используемый в контексте данного документа, относится к ароматическому моноциклическому кольцу или к ароматической бициклической кольцевой системе, содержащей по меньшей мере один гетероатом, независимо выбранный из группы, состоящей из N, O и S. Ароматические моноциклические кольца представляют собой пяти- или шестичленные кольца, содержащие по меньшей мере один гетероатом, независимо выбранный из группы, состоящей из N, O и S. Пятичленные ароматические моноциклические кольца имеют две двойные связи, и шестичленные ароматические моноциклические кольца имеют три двойные связи. Примером бициклических гетероарильных групп является моноциклическое гетероарильное кольцо, прикрепленное к исходному молекулярному фрагменту и конденсированное с моноциклической циклоалкильной группой, которая определена в данном документе, моноциклическая арильная группа, которая определена в данном документе, моноциклическая гетероарильная группа, которая определена в данном документе, или моноциклический гетероцикл, который определен в данном документе. Типичные примеры гетероарила включают в себя, без ограничения, индолил, пиридинил (в том числе пиридин-2-ил, пиридин-3-ил, пиридин-4-ил), пиримидинил, пиразинил, пиридазинил, пиразолил, пирролил, бензопиразолил, 1,2,3-триазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, имидазолил, тиазолил, изотиазолил, тиенил, бензимидазолил, бензотиазолил, бензоксазолил, бензоксадиазолил, бензотиенил, бензофуранил, изобензофуранил, фуранил, оксазолил, изоксазолил, пуридил, изоиндолил, хиноксалинил, индазолил, хиназолинил, 1,2,4-триазинил, 1,3,5-триазинил, изохинолинил, хинолинил, 6,7-дигидро-1,3-бензотиазолил, имидазо[1,2-a]пиридинил, нафтиридинил, пиридоимидазолил, тиазоло[5,4-b]пиридин-2-ил, тиазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил. Термины "гетероцикл", или "гетероциклический", или "гетероциклил", используемые в контексте данного документа, означают моноциклический гетероцикл, бициклический гетероцикл (гетеробициклический) или трициклический гетероцикл. Моноциклический гетероцикл представляет собой трех-, четырех-, пяти-, шести-, семи- или восьмичленное кольцо, содержащее по меньшей мере один гетероатом, независимо выбранный из группы, состоящей из O, N и S. Трех- или четырехчленное кольцо содержит ноль или одну двойную связь и один гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N и S. Пятичленное кольцо содержит ноль или одну двойную связь и один, два или три гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Шестичленное кольцо содержит ноль, одну или две двойных связи и один, два или три гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Семи- и восьмичленные кольца содержат ноль, одну, две или три двойные связи и один, два или три гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Типичные примеры моноциклических гетероциклов включают в себя, без ограничения, азетидинил, азепанил, азиридинил, диазепанил, 1,3-диоксанил, 1,3-диоксоланил, 1,3-дителиланил, 1,3-дителиланил, имидазолинил, имидазолидинил, изотиазолинил, изотиазолидинил, изоксазолинил, изоксазолидинил, морфолинил, оксадиазолинил, оксадиазолидинил, оксазолинил, оксазолидинил, оксетанил, пиперазинил, пиперидинил, пиранил, пиразолинил, пиразолидинил, пирролинил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиренил, тиадиазолидинил, тиадиазолидинил, 1,2-тиазинанил, 1,3-тиазинанил, тиазолинил, тиазолидинил, тиоморфолинил, 1,1-

диоксидотиоморфолинил (тиоморфолинсульфон), тиопиранил и тритианил. Бициклический гетероцикл представляет собой моноциклический гетероцикл, конденсированный с фенильной группой, или моноциклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим циклоалкилом, или моноциклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим циклоалкенилом, или моноциклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим гетероциклом, или мостиковую моноциклическую гетероциклическую кольцевую систему, в которой два несмежных атома в кольце связаны алкиленовым мостиком из 1,2,3 или 4 атомов углерода или алкиленовым мостиком из двух, трех или четырех атомов углерода. Типичные примеры бициклических гетероциклов включают в себя, без ограничения, бензопиранил, бензотиопиранил, хроманил, 2,3-дигидробензофуранил, 2,3-дигидробензотиенил, 2,3-дигидроизохинолин, азабицикло[2.2.1]гептил (в том числе 2-азабицикло[2.2.1]гепт-2-ил), 2,3-дигидро-1Н-индолил, изоиндолинил, октагидроциклопента[с]пирролил, октагидропирролопиридинил и тетрагидроизохинолинил. Примером трициклических гетероциклов является бициклический гетероцикл, конденсированный с фенильной группой, или бициклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим циклоалкилом, или бициклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим циклоалкенилом, или бициклический гетероцикл, конденсированный с моноциклическим гетероциклом, или бициклический гетероцикл, в котором два несмежных атома в бициклическом кольце связаны алкиленовым мостиком из 1, 2, 3 или 4 атомов углерода или алкиленовым мостиком из двух, трех или четырех атомов углерода. Примеры трициклических гетероциклов включают в себя, без ограничения, октагидро-2,5-эпоксипентален, гексагидро-2Н-2,5-метаноциклопента[б]фуран, гексагидро-1Н-1,4-метаноциклопента[с]фуран, адамантан (1-азатрицикло[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]декан) и окса-адамантан (2-оксатрицикло[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]декан). Моноциклические, бициклические и трициклические гетероциклы соединены с исходным молекулярным фрагментом через любой атом углерода или любой атом азота, содержащийся в кольцах, и могут являться незамещенными или замещенными.

Термин "гетероарилалкил", используемый в контексте данного документа, относится к гетероарильной группе, которая определена в данном документе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе.

Термин "гетероциклилалкил", используемый в контексте данного документа, относится к гетероциклической группе, которая определена в данном документе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе.

Термины "гидроксил" или "гидрокси", используемые в контексте данного документа, означают -ОН группу.

Термин "гидроксиалкил", используемый в контексте данного документа, означает по меньшей мере одну -ОН группу, присоединенную к исходному молекулярному фрагменту через алкиленовую группу, которая определена в данном документе. В некоторых случаях число атомов углерода в углеводородном заместителе (например, алкил или циклоалкил) обозначено префиксом "C<sub>x-y</sub>", причем x представляет собой минимальное число, а y — максимальное число атомов углерода в заместителе. Таким образом, например, "C<sub>1-3</sub>алкил" относится к алкильному заместителю, содержащему от 1 до 3 атомов углерода.

Термин "замещенный" относится к группе, которая может быть дополнительно замещена одной или несколькими замещающими группами, отличными от водорода. Замещающие группы включают в себя, без ограничения, галоген, =О (оксо), =S (тиоксо), циано, нитро, фторалкил, алкоксифторалкил, фторалкокси, алкил, алкенил, алкинил, галогеналкил, галогеналкокси, гетероалкил, циклоалкил, циклоалкенил, арил, гетероарил, гетероцикл, циклоалкилалкил, гетероарилалкил, арилалкил, гидрокси, гидроксиалкил, алкокси, алкоксиалкил, алкилен, арилокси, фенокси, бензилокси, аминоксид, алкиламино, ациламино, аминоксид, ариламино, сульфониламино, сульфониламино, сульфонил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аминосульфониламино, сульфониламино, -COOH, кетон, амид, карбамат и ацил.

Термин "====" означает одинарную связь (—) или двойную связь (==) или тройную связь (≡).

В случае соединений, описанных в данном документе, группы и их заместители могут быть подобраны в соответствии с допустимой валентностью атомов и заместителей таким образом, чтобы подобранные группы и заместители обеспечивали в результате стабильное соединение, например, которое не подвергается спонтанно превращению, как например, посредством перегруппировки, циклизации, отщепления и т.д. Термины "введение" или "осуществление введения", используемые в контексте данного документа, относятся к обеспечению, приведению в контакт и/или доставке соединения или конъюгата с помощью любого подходящего пути для достижения желаемого эффекта. Эти соединения или конъюгаты можно вводить субъекту несколькими путями, в том числе, без ограничения, перорально, через глаза, назально, внутривенно, местно, в виде аэрозолей, суппозитория и т.д., и их можно применять в комбинации. В контексте данного документа "рак" может включать в себя любую клетку или ткань, полученную из опухоли, новообразования, раковых клеток, ткани в предраковом состоянии, клеточной линии, злокачественного новообразования или любого другого источника клеток, которые имеют потенциал к распространению и росту в неограниченной степени. Раковые клетки могут быть получены из встречающихся в естественных условиях источников или могут быть созданы искусственно. Раковые клетки также могут быть способны к инвазии в другие ткани и метастазированию. Раковые клетки дополнительно



включают любые злокачественные клетки, которые прорастают в другие ткани и/или метастазируют. Одну или несколько раковых клеток в рамках организма можно также называть раком, опухолью, новообразованием, опухолевым ростом, злокачественным новообразованием или любым другим термином, используемым в данной области техники для описания клеток в раковом состоянии. Рак может включать в себя, например, меланому, рак головного мозга, рак легкого, рак надпочечника, рак печени, рак почки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак желудка, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак анального канала, рак предстательной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак шейки матки, лимфому, лейкоз, миелому, гемобластоз, гепатоцеллюлярную карциному, ретинобластому, глиому, саркому, бластому, плоскоклеточную карциному и аденокарциному.

Термины "контроль", "эталонный уровень" и "эталон" используются в данном документе взаимозаменяемо. Эталонный уровень может представлять собой предварительно определенное значение или диапазон, который используют в качестве точки отсчета, относительно которой оценивают измеренный результат. "Контрольная группа" в контексте данного документа относится к группе контрольных субъектов. Предварительно определенный уровень может представлять собой граничное значение относительно контрольной группы. Предварительно определенный уровень может представлять собой среднее значение в контрольной группе. Граничные значения (или предварительно определенные граничные значения) можно определить с помощью методики адаптивной модели прогнозирования (AIM). Граничные значения (или предварительно определенные граничные значения) можно определить с помощью анализа кривой зависимости чувствительности от частоты ложно положительных заключений (ROC) в биологических образцах из группы пациентов. ROC анализ, который в целом известен в области биологии, представляет собой определение способности анализа отличать одно состояние от другого. Описание ROC анализа представлено в P.J. Heagerty et al. (*Biometrics* 2000, 56, 337-44), раскрытие которого тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте. В качестве альтернативы, граничные значения можно определить с помощью квартильного анализа биологических образцов из группы пациентов. Например, граничное значение можно определить посредством выбора значения, которое соответствует любому значению в диапазоне 25-го-75-го перцентилей, предпочтительно, значение, которое соответствует 25-му перцентилю, 50-му перцентилю или 75-му перцентилю, и, более предпочтительно, 15-му перцентилю. Такие статистические анализы можно осуществлять с применением любого способа, известного в уровне техники, и они могут быть реализованы в любом количестве коммерчески доступных пакетов программного обеспечения (например, от Analyse-it Software Ltd., Лидс, Великобритания; Stata-Corp LP, Колледж-Стейшен, Техас, США; SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина, США). Уровни в здоровом состоянии или нормальные уровни или диапазоны для мишени или для активности белка можно определять в соответствии со стандартной практикой. Контроль может представлять собой субъекта, о болезненном состоянии которого известно, или образец от него. Субъект может являться здоровым, больным, больным до лечения, больным во время лечения, больным после лечения или здоровым после лечения или может характеризоваться комбинацией этих состояний, или образец может представлять собой образец от субъекта, который является здоровым, больным, больным до лечения, больным во время лечения, больным после лечения или здоровым после лечения или может характеризоваться комбинацией этих состояний. Термин "нормальный субъект", используемый в контексте данного документа, означает здорового субъекта, т.е. субъекта, не имеющего клинических признаков или симптомов заболевания. Нормальный субъект подвергается клинической оценке в отношении невыявляемых в иных условиях признаков или симптомов заболевания, причем данная оценка может включать в себя обычный физический осмотр и/или лабораторное исследование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контроль представляет собой здоровый контроль. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контроль содержит злокачественную опухоль.

Термины "эффективная доза", или "терапевтическая доза", или "терапевтически эффективное количество", или "эффективное количество", используемые в контексте данного документа, означают количество, достаточное для обеспечения терапевтического эффекта, или дозу лекарственного средства, эффективную в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективную дозу может определить квалифицированный специалист в данной области техники, и она может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивида, способ введения, стадия и тяжесть заболевания, общее состояние здоровья субъекта, решение лечащего врача и способность лекарственного средства обеспечивать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезные эффекты превосходят любые токсические или вредные эффекты вещества. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному для достижения желаемого профилактического результата в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени. Как правило, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до заболевания или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Термины "ингибировать" или "ингибирование" означают, что активность снижается или предотвращается в присутствии ингибитора, в противоположность отсутствию ингибитора. Термин "ингибиро-

вание" относится к снижению или понижающей регуляции процесса или к устранению стимула для процесса, что приводит в результате к отсутствию или сведению к минимуму экспрессии или активности биологического маркера или полипептида. Ингибирование может быть прямым или косвенным. Ингибирование может быть специфическим, то есть ингибитор ингибирует биологический маркер или полипептид, а не другие.

"Образец" или "исследуемый образец" в контексте данного документа может означать любой образец, в котором следует выявить или определить присутствие и/или уровень соединения или мишени. Образцы могут включать в себя жидкости, растворы, эмульсии, смеси или суспензии. Образцы могут включать в себя медицинский образец. Образцы могут включать в себя любую биологическую жидкость или ткань, такую как кровь, цельная кровь, фракции крови, такие как плазма и сыворотка крови, мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), мышца, интерстициальная жидкость, пот, слюна, моча, слезы, синовиальная жидкость, костный мозг, спинномозговая жидкость, выделения из носа, мокрота, околоплодные воды, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, желудочный лаваж, рвотные массы, каловые массы, ткань легкого, мононуклеарные клетки периферической крови, общие лейкоциты, клетки лимфатических узлов, клетки селезенки, клетки небных миндалин, раковые клетки, опухолевые клетки, желчь, пищеварительные соки, кожа или их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления образец содержит аликвоту. В соответствии с другими вариантами осуществления образец содержит биологическую жидкость. Образцы могут быть получены с помощью любых средств, известных в уровне техники. Образец можно применять непосредственно после получения от пациента или его можно подвергнуть предварительной обработке, как например, с помощью фильтрации, перегонки, экстрагирования, концентрирования, центрифугирования, инактивации мешающих компонентов, добавления реактивов и т.п., с целью модификации свойств образца неким образом, как обсуждается в данном документе, или, в ином случае, как известно в уровне техники. Образцы могут быть получены до постановки диагноза, до лечения, во время лечения, после лечения или после постановки диагноза или в несколько из этих моментов.

Термин "специфичность", используемый в контексте данного документа, относится к числу истинно-отрицательных результатов, поделенному на число истинно-отрицательных результатов плюс число ложно-положительных результатов, причем специфичность ("spec") может находиться в пределах диапазона  $0 < \text{spec} < 1$ . Следовательно, предпочтительным является способ, который характеризуется и чувствительностью, и специфичностью, равной один или 100%.

Под фразой "специфически связывается" обычно подразумевается, что соединение или конъюгат связываются с мишенью, когда они связываются с мишенью легче, чем они будут связываться со случайной несвязанной мишенью. "Субъект" в контексте данного документа может означать млекопитающее, которое желает или нуждается в описанных в данном документе соединениях или способах. Субъект может представлять собой человека или отличное от человека животное. Субъект может представлять собой млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой примата или отличное от примата млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой примата, такого как человек; отличное от примата млекопитающее, такое как, например, собака, кошка, лошадь, корова, свинья, мышь, крыса, верблюд, лама, коза, кролик, овца, хомяк и морская свинка; или отличное от человека примата, такого как, например, обезьяна, шимпанзе, горилла, орангутан и гиббон. Субъект может иметь любой возраст или стадию развития, как например, взрослый, подросток или младенец. Субъект может представлять собой самца или самку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет конкретный генетический маркер.

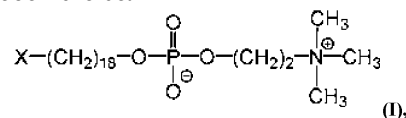
В контексте данного документа термин "токсичный" относится к количеству химической молекулы, средства или вещества, которое будет вредным для субъекта или вызывает какой-либо неблагоприятный эффект. Термин "нетоксичный" относится к веществу, которое характеризуется относительно низкой степенью, в которой оно может причинять вред субъекту. "Цитотоксический" относится к химической молекуле, среде или веществу, которое является токсичным для клеток. Токсичность может относиться к воздействию на весь организм, такой как животное, бактерия, растение или другой субъект, которые определены в данном документе, а также к воздействию на структуру организма, такую как клетка (цитотоксичность), или орган (органотоксичность), такую как печень (гепатотоксичность). Основная концепция токсикологии заключается в том, что эффекты являются дозозависимыми; даже вода может приводить к водной интоксикации при приеме в достаточно больших дозах, в то время как даже для очень токсичного вещества, такого как змеиный яд, существует доза, ниже которой отсутствует выявляемый токсический эффект. Композиция или соединение, которые являются относительно нетоксичными, могут обеспечивать более широкий круг субъектов, для которых можно безопасно применять композицию или соединение без серьезных проблем или рисков в отношении безопасности.

Термины "лечить", "получающий лечение" или "осуществление лечения", используемые в контексте данного документа, относятся к терапевтическому воздействию, при котором цель заключается в замедлении (облегчении) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания или в получении благоприятных или желаемых клинических результатов. В контексте настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают в себя, без ограничения, облегчение

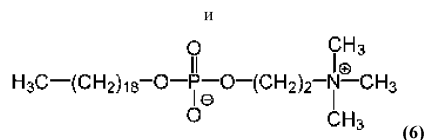
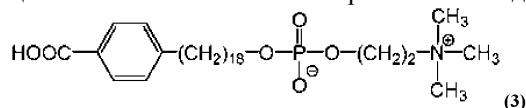
симптомов; снижение степени выраженности состояния, нарушения или заболевания; стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния при состоянии, нарушении или заболевании; задержку появления или замедление развития состояния, нарушения или заболевания; ослабление состояния, нарушения или болезненного состояния и ремиссию (или частичную, или полную), либо выявляемую, либо невыявляемую, или усиление или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение также включает в себя продление жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии получения лечения. "Лечение" или "осуществление лечения" применительно к защите субъекта от заболевания означают сдерживание, подавление, ослабление или полное устранение заболевания. Предупреждение заболевания включает введение композиции согласно настоящему изобретению субъекту до появления заболевания. Сдерживание заболевания включает в себя введение композиции согласно настоящему изобретению субъекту после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление или ослабление заболевания включает введение композиции согласно настоящему изобретению субъекту после клинического проявления заболевания. Заболевание может представлять собой рак.

## 2. Эфиры фосфолипида.

В данном документе представлены молекулы эфира фосфолипида (PLE). PLE может соответствовать формуле I или представлять собой его соль

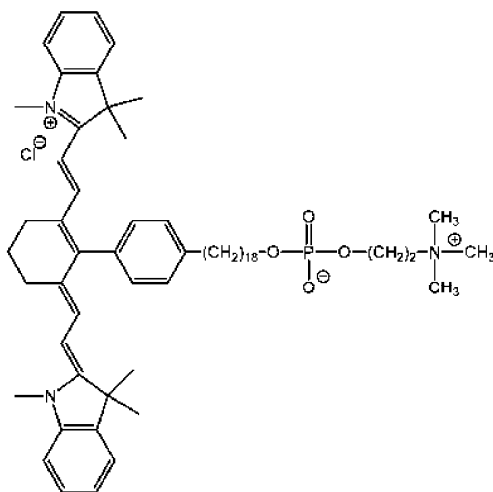
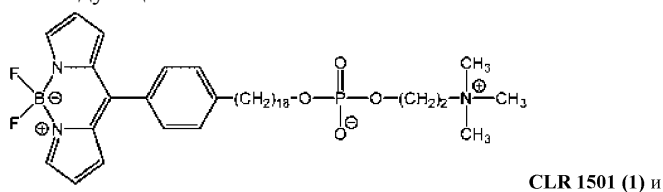


причем X представляет собой водород, метил или фенил, замещенный карбоксилком. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PLE является выбранным из следующего



PLE может быть конъюгирован с выявляемым фрагментом (также называемым репортером или меткой), таким как, например, флуоресцентная молекула, хемоллюминесцентная молекула, радиоизотопная метка, магнитная метка, молекула, выявляемая в инфракрасной области спектра, или их комбинация. Магнитные метки представляют собой метящие молекулы, которые при достаточном связывании с магнитным бесконтактным сенсором могут выявляться магнитным бесконтактным сенсором и вызывать подачу сигнала магнитным бесконтактным сенсором. Магнитные метки могут включать в себя один или несколько материалов, выбранных из парамагнитных, суперпарамагнитных, ферромагнитных, антиферромагнитных материалов, их комбинаций и т.п. Флуоресцентные метки представляют собой метящие фрагмент, которые могут быть выявлены с помощью детектора флуоресценции. Подходящие флуоресцентные молекулы (флуорофоры) включают в себя, без ограничения, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, сукцинимидиловые сложные эфиры карбоксифлуоресцеина, сукцинимидиловые сложные эфиры флуоресцеина, 5-изомер флуоресцеиндихлортриазина, "запертый" карбоксифлуоресцеин-аланин-карбоксамид, оregon зеленый 488, оregon зеленый 514; люцифер желтый, акридиновый оранжевый, родамин, тетраметилродамин, тexasский красный, пропидиум йодид, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазоилкарбоцианин йодид), тетрабромродамин 123, родамин 6G, TMRM (метилловый сложный эфир тетраметилродамина), TMRE (этиловый сложный эфир тетраметилродамина), тетраметилрозамин, родамин В и 4-диметиламинотетраметилрозамин, зеленый флуоресцентный белок, зеленый флуоресцентный белок со сдвигом флуоресценции в синюю область спектра, зеленый флуоресцентный белок со сдвигом флуоресценции в голубую область спектра, зеленый флуоресцентный белок со сдвигом флуоресценции в красную область спектра, зеленый флуоресцентный белок со сдвигом флуоресценции в желтую область спектра, 4-ацетиамидо-4'-изотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; акридин и производные, такие как акридин, акридин-изотиоцианат; 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфоновую кислоту (EDANS); 4-амино-N-[3-винилсульфонил]фенил]нафт-алимид-3,5-дисульфат; N-(4-анилино-1-нафтил)малеимид; антралиламид; 4,4-дифтор-5-(2-тиенил)-4-бора-3а,4а-диаза-5-индацен-3-пропионовую кислоту BODIPY; каскад синий (cascade blue); бриллиантовый желтый; кумарин и производные: кумарин, 7-амино-4-метилкумарин (АМС, кумарин 120), 7-амино-4-трифторметилкумарин (кумарин 151); цианиновые красители; цианозин; 4',6-диаминидино-2-фенилиндол (DAPI); 5',5"-дибромпирогаллол-сульфонафталин (бромпирогаллоловый красный); 7-диэтиламино-3-(4'-изотиоцианатофенил)-4-метилкумарин; диэтилентриамин-пентаацетат; 4,4'-диизотиоцианатодигидростильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; 5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонилхлорид (DNS, дансилхлорид); 4-диметиламинофенилазофенил-4'-

изотиоцианат (DABITC); эозин и производные: эозин, эозин-изотиоцианат, эритрозин и производные: эритрозин В, эритрозин, изотиоцианат; этидий; флуоресцеин и производные: 5-карбоксихлуоресцеин (FAM), 5-(4,6-дихлортриазин-2-ил)амино-1-флуоресцеин (DTAF), 2',7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксихлуоресцеин (JOE), флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, QFITC, (XRITC); флуорескамин; IR144; IR1446; малахитовый зеленый-изотиоцианат; 4-метилумбелли-феронорткресолфталеин; нитротирозин; парарозанилин; феноловый красный; В-фиоксеритрин; о-фталевый диальдегид; пирен и производные: пирен, пирен-бутират, сукцинимидил-1-пирен; бутиратные квантовые точки; реактивный красный 4 (бриллиантовый красный 3В-А Cibacron™), родамин и производные: 6-карбоксих-родамин (ROX), 6-карбоксихродамин (R6G), "лиссамин" родамин В сульфонилхлорид-родамин (Rhod), родамин В, родамин 123, родамин Х-изотиоцианат, сульфородамин В, сульфородамин 101, сульфонилхлоридное производное сульфородамина 101 (техасский красный); N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихродамин (TAMRA); тетраметилродамин; тетраметилродамин-изотиоцианат (TRITC); рибофлавин; 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфоновую кислоту (EDANS), 4-(4'-диметиламинофенилазо)бензойную кислоту (DABCYL), розоловую кислоту; CAL Fluor Orange 560; хелатные производные тербия; Cu 3; Cu 5; Cu 5.5; Cu 7; IRD 700; IRD 800; La Jolla Blue; фталоцианин и нафталоцианин, кумарины и родственные красители, ксантеновые красители, такие как родолы, резорфуины, биманы, акридины, изоиндолы, дансиловые красители, гидразиды аминифталевоы кислоты, такие как люминол и производные изолюминола, аминифталимиды, аминонафталимиды, аминобензофураны, аминохинолины, дицианогидрохиноны, флуоресцентные комплексы европия и тербия; их комбинации и т.п. Выявляемый фрагмент может быть ковалентно связан с PLE или может быть соединен с PLE расщепляемым линкером. Например, меченый PLE может быть выбран из следующего

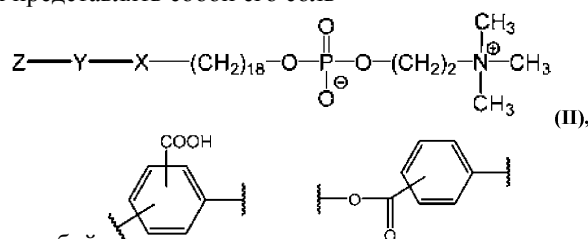


Вышеуказанное соединение (1) представляет собой PLE (3), в котором флуоресцентный фрагмент, BODIPY, стабильно связан с PLE, а также может иметь название CLR 1501. Вышеуказанное соединение (2) представляет собой PLE (3), в котором молекула, выявляемая в ближней части инфракрасной области спектра, IR-775, стабильно связан с PLE, а также может иметь название CLR 1502. Соединения (1) и (2) также могут называться конъюгатом фосфолипид-лекарственное средство (PDC).

PLE или конъюгат с ним могут являться специфическими в отношении опухолевой или раковой клетки. После введения субъекту PLE или конъюгат с ним могут локализоваться в опухолевой или раковой клетке. PLE или конъюгат с ним могут активнее включаться в опухолевую или раковую клетку, нежели в здоровую клетку. PLE или конъюгат с ним могут включаться по меньшей мере приблизительно в 2-кратно, по меньшей мере приблизительно в 3-кратно, по меньшей мере приблизительно в 4-кратно, по меньшей мере приблизительно в 5-кратно, по меньшей мере приблизительно в 6-кратно, по меньшей мере приблизительно в 7-кратно, по меньшей мере приблизительно в 8-кратно, по меньшей мере приблизительно в 9-кратно, по меньшей мере приблизительно в 10-кратно, по меньшей мере приблизительно в 15-кратно, по меньшей мере приблизительно в 20-кратно, по меньшей мере приблизительно в 25-кратно, по меньшей мере приблизительно в 30-кратно большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками.

3. Конъюгаты фосфолипид-флаваглин.

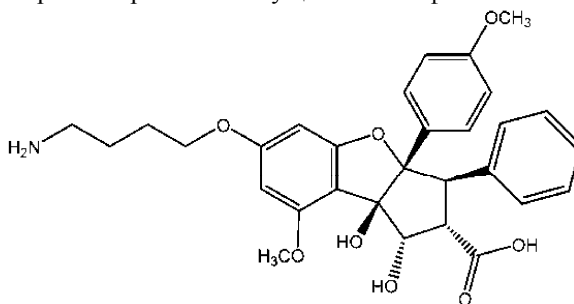
PLE может быть конъюгирован через линкер с флаваглиновым соединением с образованием конъюгата фосфолипид-флаваглин (также называемого конъюгатом PLE-флаваглин). Конъюгат может соответствовать формуле II или представлять собой его соль



причем X представляет собой или , или метилен, или связь; Y представляет собой линкер, содержащий дисульфид; и Z представляет собой флаваглиновое противораковое лекарственное средство. Конъюгат с формулой II также может называться конъюгатом фосфолипид-лекарственное средство (PDC).

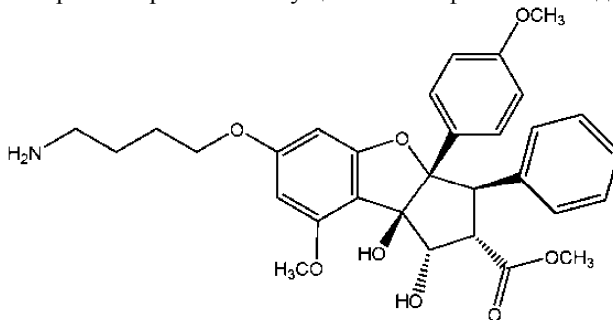
Флаваглины представляют собой семейство натуральных продуктов, которые обнаруживаются в растениях рода *Aglaia* (Meliaceae). Флаваглины имеют циклопента[b]бензофурановый остов. Флаваглины могут характеризоваться сильной инсектицидной, противогрибковой, противовоспалительной, нейропротекторной, кардиопротекторной и противораковой активностями. Флаваглины могут повышать эффективность химиотерапий и/или смягчать неблагоприятное воздействие химиотерапии в отношении сердца. Флаваглины могут включать в себя, например, FLV1, FLV3, его производное или аналог или их комбинацию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флаваглин содержит FLV1 или его соль



FLV1 (4).

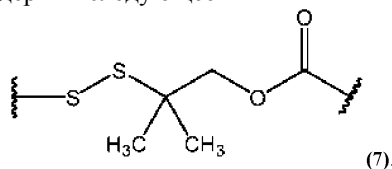
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флаваглин содержит FLV3 или его соль



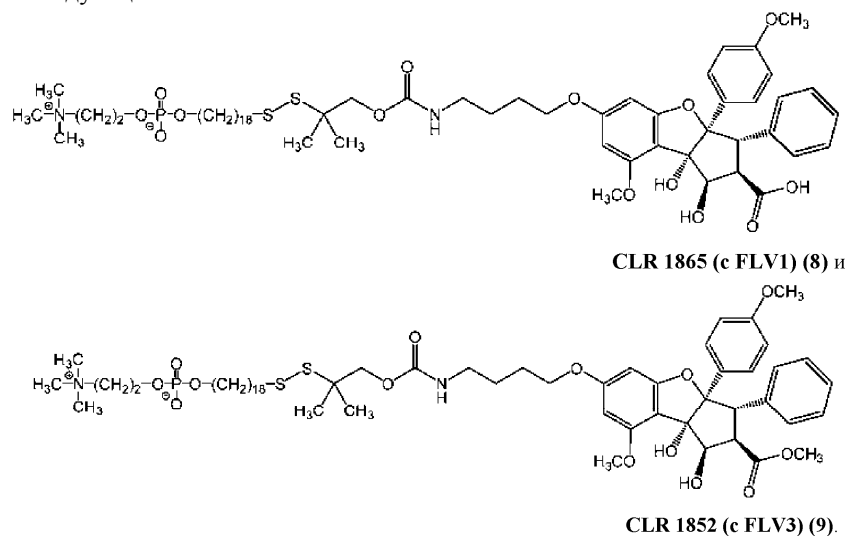
FLV3 (5).

Соединение флаваглин может существовать в виде стереоизомера, в котором присутствуют асимметричные или хиральные центры. Стереоизомер представляет собой "R-" или "S-" форму в зависимости от конфигурации заместителей относительно хирального атома углерода. Термины "R" и "S", используемые в контексте данного документа, представляют собой конфигурации, которые определены в IUPAC 1974 Recommendations for Section E, Fundamental Stereochemistry, в Pure Appl. Chem., 1976, 45, 13-30. Настоящим раскрытием предусмотрены различные стереоизомеры и их смеси, и они специально включены в объем настоящего изобретения. Стереоизомеры включают в себя энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров или диастереомеров. Отдельные стереоизомеры соединений могут быть получены с помощью синтеза из коммерчески доступных исходных материалов, которые содержат асимметричные или хиральные центры, или посредством получения рацемических смесей, следуя способам разделения, хорошо известным квалифицированному специалисту в данной области техники. Примерами этих способов разделения является (1) прикрепление смеси энантиомеров к хиральному вспомогательному средству, разделение полученной в результате смеси диастереомеров посредством перекристаллизации или хроматографии и необязательного отделения оптически чистого продукта от вспомогательного средства, как описано в Furniss, Hannaford, Smith, and Tatchell, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry," 5th edition (1989), Longman Scientific & Technical, Essex CM20 2JE, England, или (2) прямое

разделение смеси оптических энантиомеров на колонках для хиральной хроматографии, или (3) способы дробной перекристаллизации. Следует понимать, что соединение флаваглин может иметь таутомерные формы, а также геометрические изомеры, и что они также составляют варианты осуществления настоящего раскрытия. Линкер может представлять собой расщепляемый линкер, такой как дисульфид, и он специально сконструирован для доставки флаваглина к опухолевой или раковой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит дисульфид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит следующее



В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгат фосфолипид-флаваглин является выбранным из следующего:



Настоящее раскрытие также включает в себя меченое изотопом соединение, такое как меченый изотопом PLE, меченый изотопом флаваглин, меченый изотопом линкер или меченый изотопом конъюгат фосфолипид-флаваглин. Меченое изотопом соединение является идентичным соединениям, подробно изложенным в данном документе, за исключением того факта, что один или несколько атомов заменены на атом, имеющий атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, которые обычно обнаруживаются в природе. Примерами изотопов, подходящих для включения в соединения согласно настоящему изобретению, являются водород, углерод, азот, кислород, фосфор, сера, фтор и хлор, как например, без ограничения,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $^{36}\text{Cl}$ , соответственно. Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т.е.  $^2\text{H}$ , может давать определенные терапевтические преимущества, являющиеся результатом большей метаболической стабильности, например, увеличенный период полужизни *in vivo* или уменьшенные требования к дозировке, и, следовательно, они могут быть предпочтительными в некоторых обстоятельствах. Соединение может включать позитронно-активные изотопы для медицинской визуализации и исследованиях методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) для определения распределения рецепторов. Подходящие позитронно-активные изотопы, которые можно включать в соединения, представляют собой  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{18}\text{F}$ . Меченные изотопами соединения обычно могут быть получены с помощью общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных тем, которые описаны в приложенных примерах, с применением соответствующего меченого изотопом реактива вместо реактива, не меченого изотопом.

Раскрытый PLE или конъюгат фосфолипид-флаваглин могут существовать в виде фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям или цвиттериям соединений, которые являются растворимыми или диспергируемыми в воде или масле, подходящими для лечения нарушений без неоправданной токсичности, раздражения и аллергической реакции соизмеримо с обоснованным соотношением польза/риск и эффективными для их предполагаемого применения. Соли могут быть получать в ходе окончательного выделения и очистки соединений или отдельно посредством обеспечения реакции аминоксислот с подходящей кислотой. Например, соединение можно растворить в подходящем растворителе, таком как, без ограничения, метанол и вода, и обработать по меньшей мере одним эквивалентом кислоты, подобной соляной кислоте. Полученную соль можно осадить и выделить посредством фильтрования и сушить при пониженном давлении. В качестве альтернативы, растворитель и избыточную кислоту можно удалить при пониженном давлении с обеспе-

чением соли. Типичные соли включают в себя ацетат, адипат, альгинат, цитрат, аспаргат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, соль камфорной кислоты, камфорсульфонат, диглюконат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, формиат, изетионат, фумарат, лактат, малеат, метансульфонат, нафтиленсульфонат, никотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, оксалат, малеат, пивалат, пропионат, сукцинат, тарترات, тиохлорацетат, трифторацетат, глутамат, паратолуолсульфонат, ундеканат, соль соляной кислоты, соль бромистоводородной кислоты, соль серной кислоты, соль фосфорной кислоты и т.п. Аминогруппы соединений также могут быть кватернизированы алкилхлоридами, бромидами и йодидами, такими как метил, этил, пропил, изопропил, бутил, лаурил, миристил, стеарил и т.п. Соли присоединения оснований можно получить в ходе окончательного выделения и очистки раскрытых соединений посредством реакции карбоксильной группы с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат катиона металла, такого как литий, натрий, калий, кальций, магний или алюминий, или первичный, вторичный или третичный органический амин. Можно получить четвертичные аммониевые соли, такие как полученные из метиламина, диметиламина, триметиламина, триэтиламина, диэтиламина, этиламина, трибутиламина, пиридина, N,N-диметиланилина, N-метилпиперидина, N-метилморфолина, дициклогексиламина, прокаина, дибензиламина, N,N-дибензилфенэтиламина, 1-эфенамина и N,N'-дибензилэтилендиамина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперидина, пиперазина и т.п.

Конъюгат фосфолипид-флаваглин может являться специфическим в отношении опухолевой или раковой клетки. После введения субъекту конъюгат фосфолипид-флаваглин может локализоваться в опухолевой или раковой клетке. Конъюгат фосфолипид-флаваглин может локализоваться или перемещаться в цитоплазму или органеллу опухолевой или раковой клетки. Конъюгат фосфолипид-флаваглин может активнее включаться в опухолевую или раковую клетку, нежели в здоровую клетку. Конъюгат фосфолипид-флаваглин может включаться по меньшей мере приблизительно в 2-кратно, по меньшей мере приблизительно в 3-кратно, по меньшей мере приблизительно в 4-кратно, по меньшей мере приблизительно в 5-кратно, по меньшей мере приблизительно в 6-кратно, по меньшей мере приблизительно в 7-кратно, по меньшей мере приблизительно в 8-кратно, по меньшей мере приблизительно в 9-кратно, по меньшей мере приблизительно в 10-кратно, по меньшей мере приблизительно в 15-кратно, по меньшей мере приблизительно в 20-кратно, по меньшей мере приблизительно в 25-кратно, по меньшей мере приблизительно в 30-кратно большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками.

Флаваглин может отщепляться от PLE, как например, вследствие расщепления *in vivo* после введения субъекту. Флаваглин может локализоваться или перемещаться в цитоплазму или органеллу опухолевой или раковой клетки. Флаваглин может активнее включаться в опухолевую или раковую клетку, нежели в здоровую клетку. Флаваглин может включаться по меньшей мере приблизительно в 2-кратно, по меньшей мере приблизительно в 3-кратно, по меньшей мере приблизительно в 4-кратно, по меньшей мере приблизительно в 5-кратно, по меньшей мере приблизительно в 6-кратно, по меньшей мере приблизительно в 7-кратно, по меньшей мере приблизительно в 8-кратно, по меньшей мере приблизительно в 9-кратно, по меньшей мере приблизительно в 10-кратно, по меньшей мере приблизительно в 15-кратно, по меньшей мере приблизительно в 20-кратно, по меньшей мере приблизительно в 25-кратно, по меньшей мере приблизительно в 30-кратно большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками.

#### а. Синтез.

PLE можно получить с помощью синтеза в соответствии с примером 1. В качестве альтернативы, PLE, который подробно описан в данном документе, может быть получен посредством синтеза с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Флаваглин можно получить с помощью синтеза в соответствии с примером 1. В качестве альтернативы, флаваглин, который подробно описан в данном документе, может быть получен посредством синтеза с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Флаваглины также являются коммерчески доступными, например, от Naouan Chemexpress Co. (Шанхай, Китай). Конъюгат PLE-флаваглин можно получить с помощью синтеза в соответствии с примером 1. В качестве альтернативы, конъюгат PLE-флаваглин, который подробно описан в данном документе, может быть получен посредством синтеза с помощью способов, известных специалисту в данной области техники.

#### 4. Фармацевтические композиции.

PLE и конъюгаты фосфолипид-флаваглин, которые подробно описаны в данном документе, можно составлять в фармацевтические композиции в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Композиция может содержать соединение (такое как PLE или конъюгат фосфолипид-флаваглин) и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в контексте данного документа, означает нетоксичный инертный твердый, полужидкий или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство для получения состава любого типа.

Путь, посредством которого вводят раскрытые PLE и конъюгаты фосфолипид-флаваглин, и форма композиции будут диктовать применяемый тип носителя. Фармацевтическая композиция может присутствовать в ряде форм, подходящих, например, для системного введения (например, перорального, рек-

тального, сублингвального, буккального, в виде имплантатов, интраназального, интравагинального, трансдермального, внутривенного, внутриартериального, внутриопухолевого, внутрибрюшинного или парентерального) или местного введения (например, кожного, легочного, назального, ушного, глазного, в системах доставки на основе липосом или посредством ионофореза). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция предназначена для введения в центральную нервную систему субъекта. Методики и составы обычно можно найти в "Remington's Pharmaceutical Sciences," (Meade Publishing Co., Easton, Pa.). Фармацевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Все носители в композициях являются необязательными.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя, например, разбавители, смазывающие средства, связующие средства, разрыхлители, красители, ароматизаторы, подсластители, антиоксиданты, консерванты, средства, способствующие скольжению, растворители, суспендирующие средства, смачивающие средства, поверхностно-активные вещества, смягчительные средства, газы-вытеснители, увлажняющие средства, порошки, средства-регуляторы pH и их комбинации. Несмотря на то что количества компонентов в композициях могут изменяться в зависимости от предпочтительного типа композиции, обычно системные композиции могут включать в себя от 0,01 до 50% соединения (такого как PLE или конъюгата фосфолипид-флаваглин) и от 50 до 99,99% до одного или нескольких носителей. Композиции для парентерального введения, как правило, могут включать в себя от 0,1 до 10% соединения и от 90 до 99,9% одного или нескольких носителей. Пероральные лекарственные формы могут включать в себя, например, по меньшей мере приблизительно 5% или от приблизительно 25% до приблизительно 50% соединения. Композиции в пероральной лекарственной форме могут включать в себя от приблизительно 50% до приблизительно 95% носителей или от приблизительно 50% до приблизительно 75% носителей. Количество носителя, используемого совместно с раскрытым соединением, является достаточным для обеспечения практически применимого количества композиции для введения в стандартной дозе соединения. Методики и композиции для получения лекарственных форм, пригодных в способах согласно настоящему изобретению, описаны в следующих источниках: Modern Pharmaceuticals, Chapters 9 and 10, Banker & Rhodes, eds. (1979); Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (1981); и Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 2nd Ed., (1976).

#### 5. Введение.

PLE или конъюгат фосфолипид-флаваглин или фармацевтические композиции, содержащие их, можно вводить субъекту. Такие композиции, содержащие соединение (такое как PLE или конъюгат фосфолипид-флаваглин), можно вводить в дозировках и с помощью методик, которые хорошо известны квалифицированным специалистам в области медицины, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, масса и состояние конкретного субъекта и путь введения.

Соединение (такое как PLE или конъюгат фосфолипид-флаваглин) можно вводить в профилактических или терапевтических целях. При профилактическом введении соединения можно вводить в количестве, достаточном для индукции ответа. При терапевтических применениях соединения вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического эффекта. Количество, достаточное для достижения этого, определено как "терапевтически эффективное количество". Количество, эффективные для этого применения, будут зависеть, например, от конкретной схемы введения композиции с соединением, способа введения, стадии и тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента и решения лечащего врача. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезные эффекты превосходят любые токсические или вредные эффекты соединения. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному для достижения желаемого профилактического результата в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени. Как правило, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до заболевания или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Например, терапевтически эффективное количество соединения может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 950 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 900 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 850 мг/кг, от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 800 мг/кг, от приблизительно 25 мг/кг до приблизительно 750 мг/кг, от приблизительно 30 мг/кг до приблизительно 700 мг/кг, от приблизительно 35 мг/кг до приблизительно 650 мг/кг, от приблизительно 40 мг/кг до приблизительно 600 мг/кг, от приблизительно 45 мг/кг до приблизительно 550 мг/кг, от приблизительно 50 мг/кг до приблизительно 500 мг/кг, от приблизительно 55 мг/кг до приблизительно 450 мг/кг, от приблизительно 60 мг/кг до приблизительно 400 мг/кг, от приблизительно 65 мг/кг до приблизительно 350 мг/кг, от приблизительно 70 мг/кг до приблизительно 300 мг/кг, от приблизительно 75 мг/кг до приблизительно 250 мг/кг, от приблизительно 80 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг, от приблизительно 85 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг и от приблизительно 90 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг.

Соединение можно вводить с помощью способов, хорошо известных в уровне техники и описанных в Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 1997, 75, 617-648); Feigner и соавт. (патент США № 5580859, выдан-



ный 3 декабря 1996 г.); Feigner (патент США № 5703055, выданный 30 декабря 1997 г.); и Carson и соавт. (патент США № 5679647, выданный 21 октября 1997 г.), причем содержание каждого из всех этих источников включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Соединение может образовывать комплексы с частицами или гранулами, которые можно вводить индивиду, например, с применением безыгольного инъектора. Специалисту в данной области техники будет известно, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого соединения, зависит, например, от пути введения. Соединение можно доставлять посредством различных путей. Типичные пути доставки включают в себя парентеральное введение, например, интрадермальную, внутримышечную или подкожную доставку. Другие пути включают в себя пероральное введение, интраназальный, интравагинальный, трансдермальный, внутривенный, внутриартериальный, внутриопухолевый, внутрибрюшинный и эпидермальный пути. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления соединение вводят субъекту внутривенно, внутриартериально или внутрибрюшинно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления соединение вводят субъекту внутривенно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления соединения вводят в составе с контролируемым высвобождением. Например, соединение может высвобождаться в кровоток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления соединения может высвобождаться в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 1 сутки, по меньшей мере приблизительно 2 суток, по меньшей мере приблизительно 3 суток, по меньшей мере приблизительно 4 суток, по меньшей мере приблизительно 5 суток, по меньшей мере приблизительно 6 суток, по меньшей мере приблизительно 7 суток, по меньшей мере приблизительно 1 неделю, по меньшей мере приблизительно 1,5 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недели, по меньшей мере приблизительно 2,5 недели, по меньшей мере приблизительно 3,5 недели, по меньшей мере приблизительно 4 недели или по меньшей мере приблизительно 1 месяц. Соединение можно вводить в виде однократной дозы, или эпизодически, или в виде многократных доз. Например, соединение можно вводить один раз каждый час, 2, 4, 8, 12, 25, 36 ч, 2, 3, 4, 5, 6 суток, 1, 2, 3 или 4 недели.

#### б. Способы.

##### а. Способы лечения рака у субъекта.

В данном документе описаны способы лечения рака у субъекта. Способ может включать в себя введение субъекту конъюгата фосфолипид-флаваглин, который подробно описан в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак является выбранным из меланомы, рака головного мозга, рака легкого, рака надпочечника, рака печени, рака почки, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, рака предстательной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака шейки матки, лимфомы, лейкоза, миеломы, гемобластома, гепатоцеллюлярной карциномы, ретинобластомы, глиомы, саркомы, бластомы, плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы.

##### б. Способы нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта.

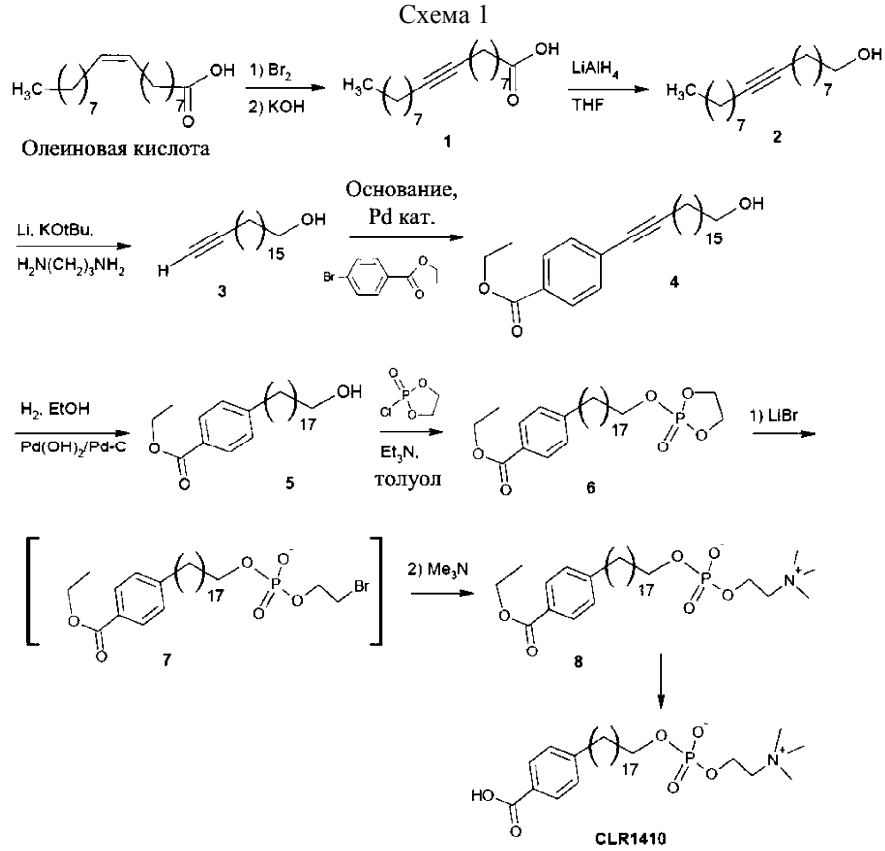
В данном документе представлены способы нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта. Способ может включать в себя введение субъекту конъюгата фосфолипид-флаваглин, который подробно описан в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак является выбранным из меланомы, рака головного мозга, рака легкого, рака надпочечника, рака печени, рака почки, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, рака предстательной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака шейки матки, лимфомы, лейкоза, миеломы, гемобластома, гепатоцеллюлярной карциномы, ретинобластомы, глиомы, саркомы, бластомы, плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы.

## Примеры

Пример 1. Химический синтез.

PLE.

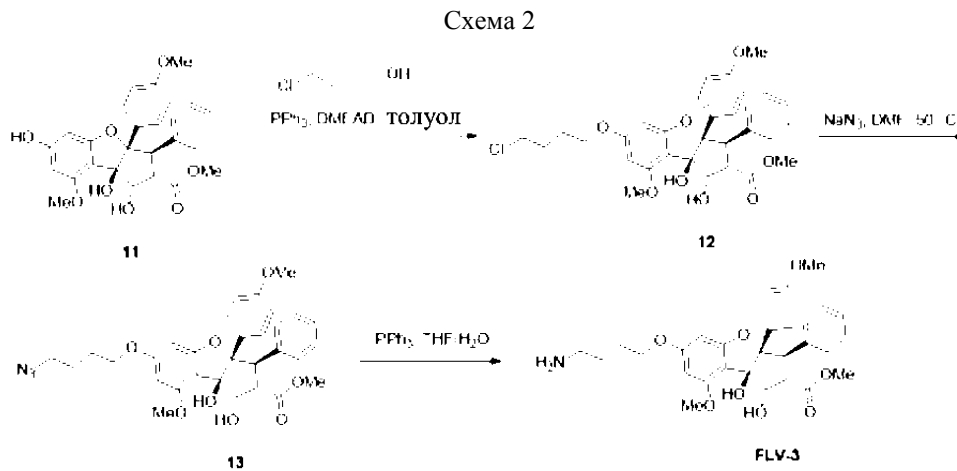
PLE получали посредством синтеза в соответствии со схемой 1, представленной ниже



Флаваглины.

Флаваглины были доступны от коммерческого поставщика. FLV1 и FLV3 приобретали у Naoyuan Chemexpress Co. (Шанхай, Китай).

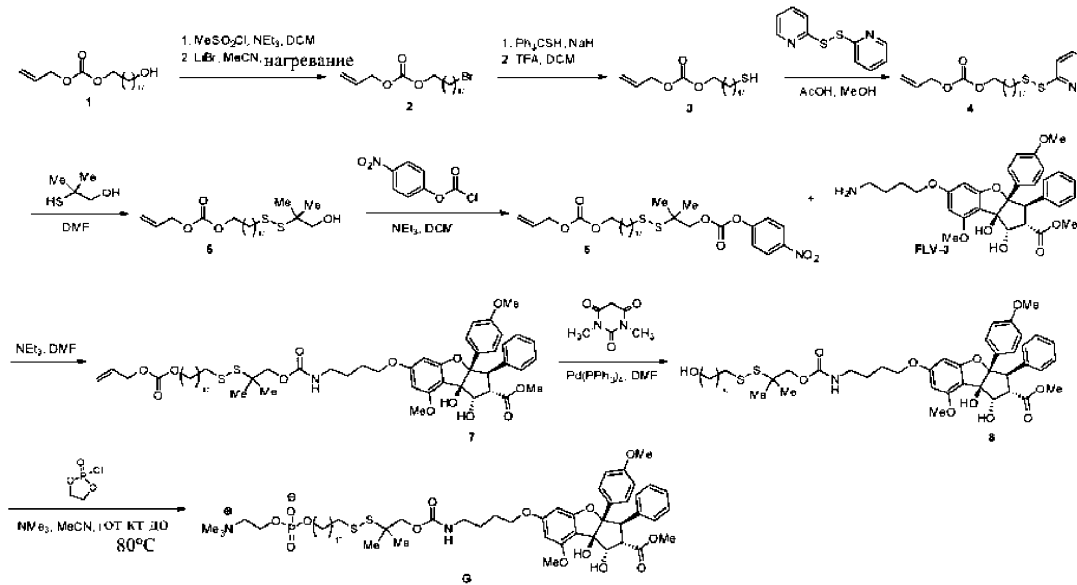
В качестве альтернативы, FLV1 и FLV3 получали посредством синтеза в соответствии со схемой 2, представленной ниже



Код	SM	Вес	Продукт	Условия	Выход	Примечания
1	13	0,317 г	FLV3	50°C, 10 часов	0,235 г (78%)	соответствует <sup>1</sup> H ЯМР
2	11	0,170 г	12	от 0°C до рт, O/N	--	реакция продолжается

Конструкции PLE-флаваглин. CLR 1852 (соединение (9)) и CLR 1865 (соединение (8)) получали посредством синтеза в соответствии со схемой 3, представленной ниже

Схема 3



Пример 2. Присутствие липидных рафтов на опухолевых клетках.

Более 100 клеточных линий подвергали окрашиванию с использованием субъединицы В холерного токсина, фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали филипином III в течение 30 мин. Как показано на фиг. 1A-1D, почти каждый исследуемый тип опухоли демонстрировал высокую концентрацию липидных рафтов в клеточной мембране (в 100 клеточных линиях, свежих образцах от пациентов и т.д.). Как показано на фиг. 1E, клетки A549 культивировали совместно с нормальными фибробластами в течение 48 ч, а затем окрашивали субъединицей В холерного токсина, фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали филипином III в течение 30 мин. Эти результаты демонстрировали, что опухолевые клетки имеют более высокую концентрацию липидных рафтов, чем нормальные клетки.

Пример 3. Селективное поглощение PDC в опухолевые клетки.

Нормальные фибробласты и опухолевые клетки Саки-2 (светлоклеточная почечно-клеточная карцинома человека) высевали и совместно культивировали в течение ночи (фиг. 1F). Клетки затем инкубировали с 5 мкМ CLR 1501 (соединение (1)) в течение 24 ч при 37°C в полной среде. На следующий день клетки промывали и совместно окрашивали ядерным красителем (Hoescht 33342). Возбуждали флуоресценцию CLR 1501, а затем выявляли с использованием фильтра для Alexa-Fluor 488. CLR 1501 на высоком уровне локализовался в клетках Саки-2 и на минимальном уровне - в нормальных фибробластах.

Пример 4. Разрушение липидных рафтов снижало поглощение PDC.

Клетки A549 высевали в течение ночи в отдельные лунки. На следующий день клетки либо не подвергали обработке (фиг. 1G), или подвергали обработке метил- $\beta$ -циклодекстрином (фиг. 1H), который, как было показано, селективно разрушает липидные рафты. Все клетки затем инкубировали в течение 24 ч с 5 мкМ CLR 1501 (соединение (1)). Разрушение большинства липидных рафтов в клетках A549 привело в результате к 60% снижению поглощения CLR 1501 (фиг. 1H) по сравнению с необработанными клетками (фиг. 1G).

Пример 5. PDC отслеживаются в эндоплазматическом ретикулуме.

Клетки аденокарциномы предстательной железы человека (PC3) высевали в течение ночи на микропланшет VI (Ibidi, Верона, Висконсин, США), а затем инкубировали с 5 мкМ CLR 1501 (соединение (1)) в течение 24 ч при температуре 37°C в полной среде. После промывания клетки подвергали совместному окрашиванию с использованием ER-tracker® согласно протоколу и визуализировали с применением конфокального светового микроскопа Nikon A1R. Возбуждали флуоресценцию CLR 1501 и ER и осуществляли выявление с применением Alexa-Fluor 488 при использовании стандартных фильтров для флуоресцеина. CLR 1501 локализовался совместно с ER в злокачественных (фиг. 1I-1K), а не в нормальных клетках (не показано).

Пример 6. PDC отслеживаются в эндоплазматическом ретикулуме.

Клеточную линию PC3 (аденокарцинома предстательной железы человека IV стадии) культивировали в течение ночи на стекле для микроскопии VI (Ibidi, Верона, Висконсин, США). На следующий день клетки инкубировали с 5 мкМ CLR 1501 (соединение (1)) в течение 24 ч при температуре 37°C в полной среде. На следующий день после промывания PBS клетки подвергали совместному окрашиванию ядерным красителем (Hoescht 33342) и маркером митохондрий (Mitotracker®) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Клетки подвергали наблюдению с применением конфокального микроскопа Nikon AIR. Возбуждали флуоресценцию CLR 1501 и осуществляли выявление с применением фильтра для Alexa-

Fluor 488, в то время как флуоресценцию ядерного красителя и митохондриального красителя возбуждали и подвергали выявлению с применением фильтра для DAPI и фильтра для тexasского красного, соответственно. CLR 1501 локализовался в митохондриях (фиг. 1L-1N).

Пример 7. PDC обеспечивают направленную доставку *in vivo*.

"Голой" мыши, несущей опухоль ободочной и прямой кишки (HCT-116), вводили инъекцией 1 мг CLR 1502 (соединение (2)), и их подвергали визуализации с помощью инфракрасной системы визуализации Pearl Infrared Imaging System. Разные цвета отражают интенсивность CLR 1502 со временем. Примерно через 5,5 ч после инъекции опухоль все еще демонстрировала красный цвет (отражающий наиболее высокое распространение CLR 1502) (фиг. 2). В течение 24 ч получали максимальное распределение CLR 1502. Первоначально нацеливание наблюдалось в пределах 30 мин (не показано).

Пример 8. Цитотоксические PDC обеспечивают нацеливание и потенциально улучшенный терапевтический индекс.

Клетки A549 (аденокарцинома легкого человека) и нормальные фибробласты кожи человека (NHDF) высевали в 96-луночные чашки в течение ночи. Все клетки подвергали обработке возрастающими концентрациями либо исходного цитотоксического соединения отдельно (FLV1 или FLV3), либо PDC (исходное цитотоксическое соединение, конъюгированное с фрагментом PLE с использованием расщепляемого линкера, CLR 1865 (соединение (8)) или CLR 1852 (соединение (9))). Исходное цитотоксическое соединение демонстрировало в отношении клеток A549 активность, практически равную активности в отношении клеток NHDF. Тем не менее, молекулы PDC демонстрировали селективность в отношении клеток A549 (фиг. 3). Молекулы PDC практически не демонстрировали воздействие в отношении клеток NHDF до самых высоких концентраций и демонстрировали активность, практически аналогичную активности исходной молекуле в клетках A549. Различие между цитотоксичностью молекулы PDC в отношении опухолевых клеток и цитотоксичностью в отношении нормальных клеток может указывать на потенциал к улучшению терапевтического индекса исходных молекул.

Пример 9. Цитотоксические PDC обеспечивают нацеливание.

Оценивали поглощение CLR 1852 (соединение (9)) в клетках A375 (меланома человека) и клетках HEK293 (эмбриональная почка человека). Клетки инкубировали с CLR 1852 (соединение (9)) в течение 24 ч. Было показано, что опухолевые клетки во всех случаях имели 6-28-кратное повышение содержания PDC по сравнению с нормальными клетками в течение 24 ч обработки (фиг. 4).

Результаты из примеров 2-9 указывали на то, что молекулы эфира фосфолипида нацеливаются на опухолевые клетки посредством липидных рафтов. PDC демонстрировали значительное поглощение в опухолевые клетки по сравнению с нормальными клетками даже в совместной культуре. При поступлении в опухолевые клетки PDC отслеживались в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. *In vivo* PDC как нацеливались на опухоль, так и быстро накапливались в опухоли. Цитотоксические PDC обеспечивали улучшенное нацеливание и потенциал по улучшению безопасности.

Пример 10. Поглощение PLE клетками.

Различные линии раковых клеток подвергали *in vitro* и *in vivo* воздействию меченого флуоресцентной меткой PLE (CLR 1501, соединение (1)). Поглощение опухолевыми клетками измеряли непрерывно в течение 24 ч. Результаты представлены в табл. 1 и на фиг. 5, 6 и 7. Соединение PLE являлось специфическим для опухолей и раковых клеток.

Меченый флуоресцентной меткой PLE (CLR 1501, соединение (1)) вводили в доброкачественные ткани, и поглощение не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 1  
Поглощение PLE клетками *in vitro*

Модельная опухоль		Вид	Категория	Поглощение в опухоль
1	PC-3 предстательной железы	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
2	A-549 легкого (NSCLC)	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
3	NCI H-69 легкого (овсяновидные клетки)	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
4	H-295 надпочечника	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
5	RL-251 надпочечника	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
6	Colon-51	SCID мышь	Аденокарцинома ободочной и прямой кишки	Есть

7	LS180 толстой кишки	SCID мышь	Аденокарцинома ободочной и прямой кишки	Есть
8	DLD1 толстой кишки	SCID мышь	Аденокарцинома ободочной и прямой кишки	Есть
9	HT-29 толстой кишки	SCID мышь	Аденокарцинома ободочной и прямой кишки	Есть
10	LS-180 толстой кишки	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
11	A-375 меланомы	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
12	HTB-77 яичника	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
13	BXPC3 поджелудочной железы	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
14	Сарап-1 поджелудочной железы	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
15	почечно-клеточная Saki-2	«голая» мышь (ортотопическая)	Аденокарцинома	Есть
16	почечно-клеточная ACHN	«голая» мышь (ортотопическая)	Аденокарцинома	Есть
17	SCC1	«голая» мышь	Плоскоклеточная карцинома	Есть
18	SCC6	«голая» мышь	Аденокарцинома	Есть
19	LpCar предстательной железы	Мышь	Аденокарцинома	Есть
20	LuCar предстательной железы	Мышь	Аденокарцинома	Есть
21	MCF-7 молочной железы	Крыса	Аденокарцинома	Есть
22	4T1 молочной железы	Эндогенная мышиная (ортотопическая)	Аденокарцинома	Есть

23	MatLyLu предстательной железы	Крыса	Аденокарцинома	Есть
24	Walker-256	Крыса	Карциносаркома	Есть
25	TRAMP предстательной железы	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
26	CT-26 толстой кишки	SCID мышь	Аденокарцинома	Есть
27	Min кишечника мыши	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
28	Меланома	Мышь	Аденокарцинома	Есть
29	SCC молочной железы	Apc <sup>Min/+</sup> мышь	Плоскоклеточная карцинома	Есть
30	AC молочной железы	Apc <sup>Min/+</sup> мышь	Аденокарцинома	Есть
31	Печеночно-клеточная карцинома	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
32	Глиома L9	Крысинный ксенотрансплантат	Глиома	Есть
33	Глиома C6	Крысинный ксенотрансплантат	Глиома	Есть
34	Глиома CNS1	Крысинный ксенотрансплантат	Глиома	Есть
35	Глиома RG2	Крысинный ксенотрансплантат	Глиома	Есть
36	Ретинобластома	Эндогенная мышинная	Бластома	Есть
37	C-тус поджелудочной железы	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
38	Kras поджелудочной железы	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
39	Шейки матки	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть
40	Саркома (Meth-A)	«голая» мышь	Фибросаркома	Есть
41	Пищевода	Эндогенная мышинная	Аденокарцинома	Есть

Таблица 2  
Поглощение CLR1404 в доброкачественные ткани

	Модельная опухоль	Вид	Категория	Поглощение в опухоль
1	Кишечный полип	Эндогенная мышинная	Аденома (доброкачественная)	Нет
2	Альвеолярная гиперплазия молочной железы	Эндогенная мышинная	Гиперплазия (доброкачественная)	Нет

Пример 11. Активность конъюгатов PLE-флаваглин в раковых клетках.

Конъюгаты PLE-флаваглин CLR 1852 (соединение (9)) и CLR 1865 (соединение (8)) вводили в клетки линии A375 (злокачественная меланома человека), A549 (аденокарцинома легкого человека), HCT 116 (рак толстой кишки человека) и NHDF (нормальные фибробласты кожи человека). Рассчитывали IC<sub>50</sub>. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3  
IC<sub>50</sub> (мкМ/мл) в различных линиях раковых клеток

Соединение	A375	A549	HCT 116	NHDF	Терапевтический индекс (ТИ)
FLV3	0,015	0,09	0,009	0,008	0,89
CLR 1852	0,9	0,02	0,06	7,2 (18,3)	360 (915)
CLR 1865	9,75	0,67	1,28	7,8 (25)	11,64 (37,3)

Цитотоксичность CLR 1852 определяли в различных концентрациях. Как показано на фиг. 8, CLR 1852 демонстрировал умеренную потерю активности по сравнению с FLV3 отдельно, возможно, вследствие неполного высвобождения. Оценивали стабильность CLR 1865 (соединение (8)), CLR 1852 (соединение (9)) и FLV3 в плазме крови с пропантелином в качестве контроля (табл. 4). Небольшое количество молекулы подвергали воздействию плазмы крови, и плазму крови затем анализировали с помощью HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) или MS (масс-спектрометрия) для определения, разложилась ли молекула. CLR 1865 и CLR 1852 демонстрировали отличную стабильность в плазме крови человека. CLR 1852 превосходил CLR 1865 в плазме крови мыши. Только CLR 1865 являлся стабильным в плазме крови мыши в течение 3,3 ч. CLR 1852 являлся стабильным в плазме крови в течение по меньшей мере 7 ч.

Таблица 4  
Стабильность в плазме крови

Соединение	Период полужизни у человека (мин.)	Период полужизни у мыши (мин.)
CLR 1852	>400	>400
CLR 1865	>400	199
Пропантелин	54	85

Терапевтический индекс (ТИ) для CLR 1865 и CLR 1852 оценивали у мышей (табл. 5). В табл. 5 представлены дозы, вводимые мышам, и количество мышей, которые оставались живыми после обработки ("3/3" показывает, что 3 из 3 мышей оставались живыми). Как CLR 1852, так и CLR 1865 демонстрировали отличное улучшение переносимости по сравнению с FLV3 отдельно. CLR 1852 не достигала максимальной переносимой дозы (MTD), возможно, вследствие того, что его растворимость ограничена большей дозой. MTD для CLR 1865 составляла от 5 до 10 мг/кг. Терапевтический индекс *in vivo* составлял по меньшей мере 25 для CLR 1852 и 12,5 для CLR 1865.

Таблица 5  
Терапевтический индекс *in vivo*

Доза (мг/кг)	FLV3	CLR 1852	CLR 1865
0,1	3/3	3/3	3/3
0,25	3/3	3/3	3/3
0,5	LD	3/3	3/3
1,0	Нет данных	3/3	3/3
5,0	Нет данных	3/3	3/3
10,0	Нет данных	3/3	2/3

Оценивали эффективность CLR 1852 в клетках HCT 116 (рак толстой кишки человека). CLR 1852 вводили в клетки HCT 116 в трех дозах по 1 мг/мл в каждой. По сравнению со средой CLR 1852 снижал объем опухоли, начиная примерно с 27 суток (фиг. 9). По сравнению со средой CLR 1852 вызывал умеренную потерю массы, предположительно, вследствие токсичности (фиг. 10). CLR 1852 обеспечивал по меньшей мере шестикратное повышение переносимости по сравнению с FLV3 отдельно (данные не показаны).

CLR 1852 и FLV3 отдельно вводили в клетки A375 и A549. Уровни FLV3 в клеточном лизате и ростовой среде измеряли с применением LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Как показано на фиг. 11, высокие уровни FLV3 присутствовали в клеточном лизате спустя 24 ч. Умеренные уровни FLV3 присутствовали в ростовой среде спустя 24 ч. Уровни внутриклеточного FLV3 достигали плато через 24 ч, в то время как внутриклеточные уровни FLV3 продолжали расти.

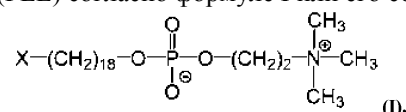
Вышеизложенное описание конкретных аспектов будет столь же полно раскрывать общий характер настоящего изобретения, как и описание других аспектов при применении знаний в рамках квалификации в данной области техники, его легко модифицировать и/или адаптировать к различным применениям таких конкретных аспектов без неоправданного экспериментирования, без отступления от общей идеи

настоящего раскрытия. Таким образом, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в рамках значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов, исходя из информации и указаний, представленных в данном документе. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, вследствие чего терминология или формулировки в данном описании должны интерпретироваться квалифицированным специалистом с учетом информации и указаний.

Охват и объем настоящего раскрытия не должны ограничиваться любым из вышеописанных иллюстративных аспектов, а должны быть определены только в соответствии со следующими пунктами формулы изобретения и их эквивалентами. Все публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы, цитируемые в данной заявке, включены посредством ссылки во всей своей полноте и с любой целью в той же мере, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка и/или другой документ были отдельно включены посредством ссылки.

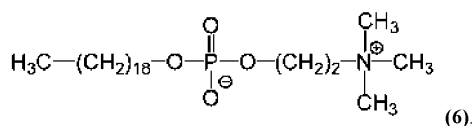
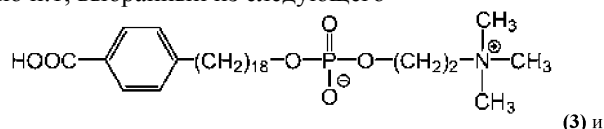
Из соображений полноты различные аспекты настоящего изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах.

Пункт 1. Эфир фосфолипида (PLE) согласно формуле I или его соль



причем X представляет собой водород, метил или фенил, замещенный карбоксилем.

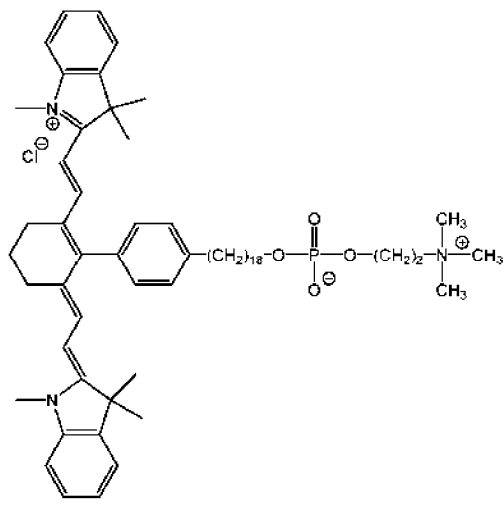
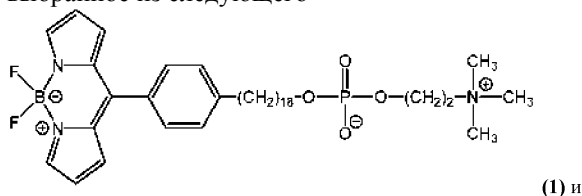
Пункт 2. PLE согласно п.1, выбранный из следующего



Пункт 3. PLE согласно п.1 или п.2, дополнительно содержащий выявляемый фрагмент, прикрепленный к нему.

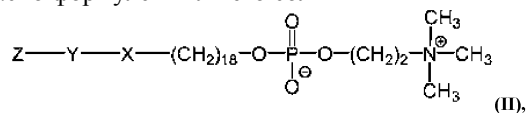
Пункт 4. Композиция, содержащая PLE согласно п.1, или п.2, или п.3 и носитель.

Пункт 5. Соединение, выбранное из следующего

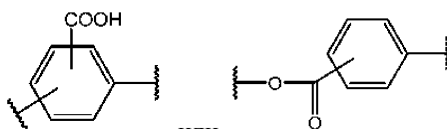


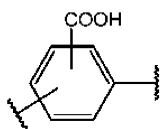
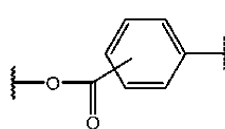
Пункт 6. Композиция, содержащая соединение согласно п.5 и носитель.

Пункт 7. Конъюгат согласно формуле II или его соль



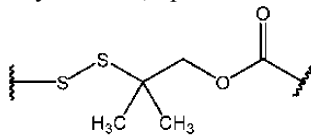




причем X представляет собой , или , или метилен, или связь; Y представляет собой линкер, содержащий дисульфид; и Z представляет собой флаваглиновое противораковое лекарственное средство.

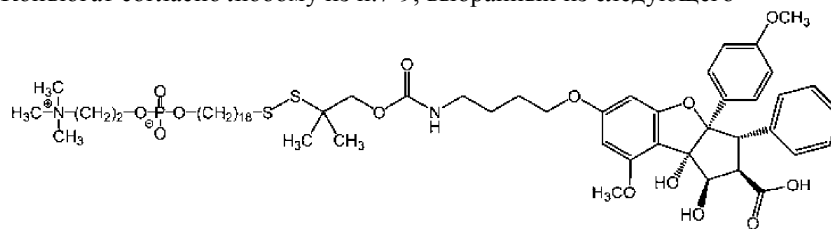
Пункт 8. Конъюгат согласно п.7, причем флаваглиновое противораковое лекарственное средство содержит FLV-1, FLV-3, его производное или аналог или их комбинацию.

Пункт 9. Конъюгат согласно любому из п.7-8, причем линкер содержит следующее

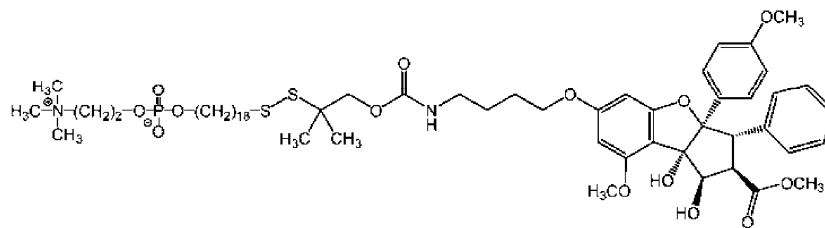


(7)

Пункт 10. Конъюгат согласно любому из п.7-9, выбранный из следующего



(8) и



(9).

Пункт 11. Композиция, содержащая конъюгат согласно любому из п.7-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

Пункт 12. Способ лечения рака у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту конъюгата согласно любому из п.7-10.

Пункт 13. Способ нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту конъюгата согласно любому из п.7-10.

Пункт 14. Способ согласно любому из п.12-13, причем флаваглиновое противораковое лекарственное средство локализуется или перемещается в цитоплазму или органеллу опухолевой или раковой клетки.

Пункт 15. Способ согласно любому из п.12-13, причем конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство являются селективными в отношении раковых клеток у субъекта.

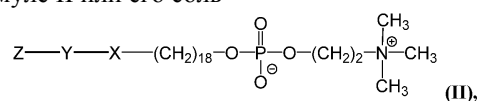
Пункт 16. Способ согласно любому из п.12-13, причем конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство включаются по меньшей мере приблизительно в 2-кратно большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками.

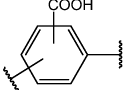
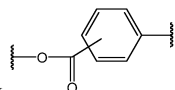
Пункт 17. Способ согласно любому из п.12-16, причем рак является выбранным из меланомы, рака головного мозга, рака легкого, рака надпочечника, рака печени, рака почки, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, рака предстательной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака шейки матки, лимфомы, лейкоза, миеломы, гемобластома, гепатоцеллюлярной карциномы, ретинобластомы, глиомы, саркомы, бластомы, плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы.

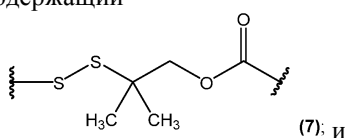
Пункт 18. Способ согласно любому из п.12-17, причем субъект представляет собой человека.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат согласно формуле II или его соль

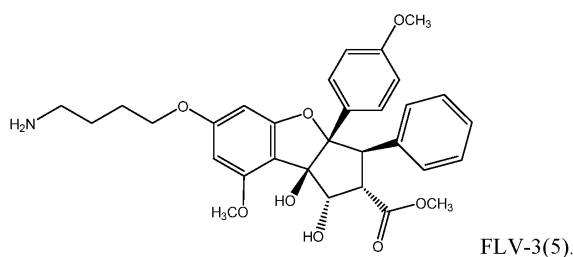
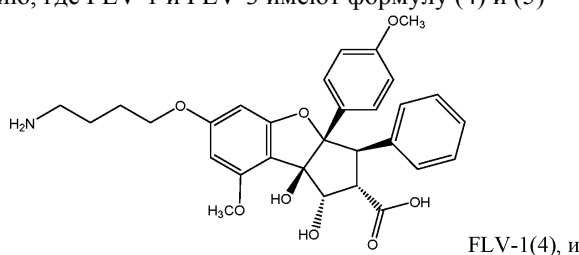


причем X представляет собой , или , или метилен, или связь;  
Y представляет собой линкер, содержащий

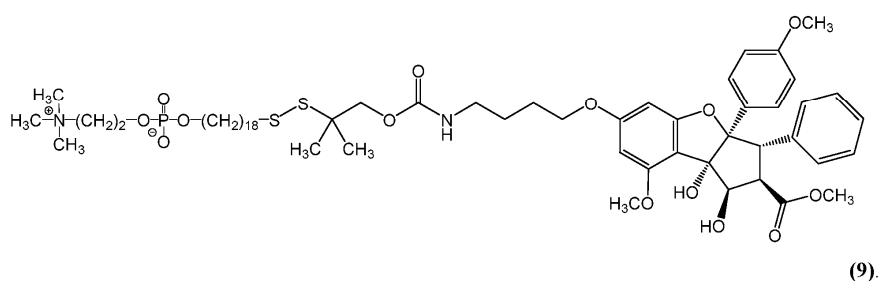
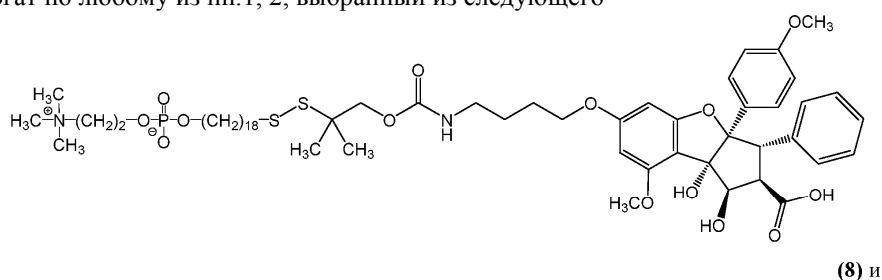


Z представляет собой флаваглиновое противораковое лекарственное средство.

2. Конъюгат по п.1, причем флаваглиновое противораковое лекарственное средство содержит FLV-1, FLV-3 или их комбинацию, где FLV-1 и FLV-3 имеют формулу (4) и (5)



3. Конъюгат по любому из пп.1, 2, выбранный из следующего



4. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата по любому из пп.1-3.

6. Способ нацеливания лекарственного средства на опухолевую или раковую клетку у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата по любому из пп.1-3.

7. Способ по любому из пп.5-6, причем флаваглиновое противораковое лекарственное средство ло-

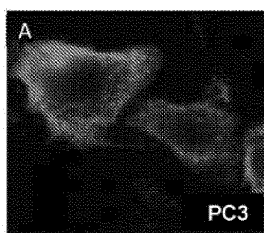
калίζεται или перемещается в цитоплазму или органеллу опухолевой или раковой клетки.

8. Способ по любому из пп.5-6, причем конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство являются селективными в отношении раковых клеток у субъекта.

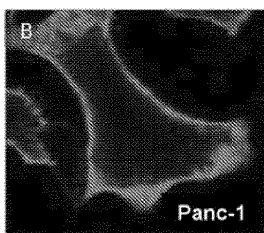
9. Способ по любому из пп.5-6, причем конъюгат или флаваглиновое противораковое лекарственное средство включаются в от приблизительно 2-кратно до приблизительно 30-кратно большее число опухолевых или раковых клеток по сравнению со здоровыми клетками.

10. Способ по любому из пп.5-9, причем рак является выбранным из меланомы, рака головного мозга, рака легкого, рака надпочечника, рака печени, рака почки, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, рака предстательной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака шейки матки, лимфомы, лейкоза, миеломы, гемобластоза, гепатоцеллюлярной карциномы, ретинобластомы, глиомы, саркомы, бластомы, плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы.

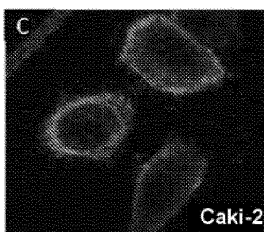
11. Способ по любому из пп.5-10, причем субъект представляет собой человека.



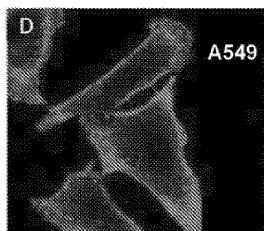
Фиг. 1А



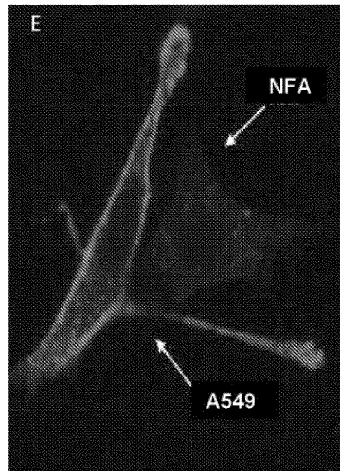
Фиг. 1В



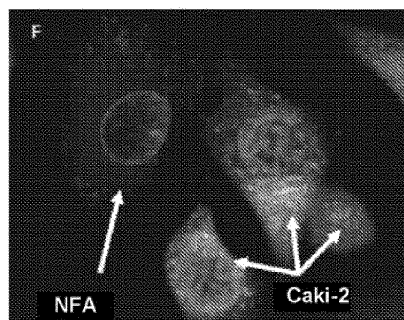
Фиг. 1С



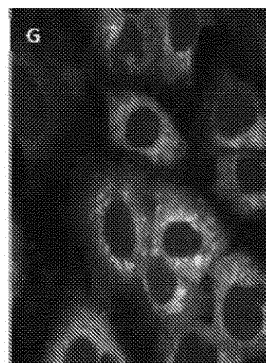
Фиг. 1D



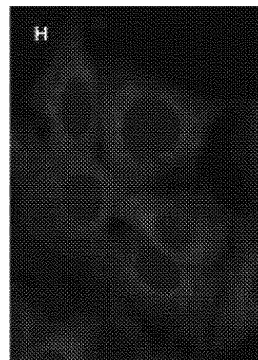
Фиг. 1Е



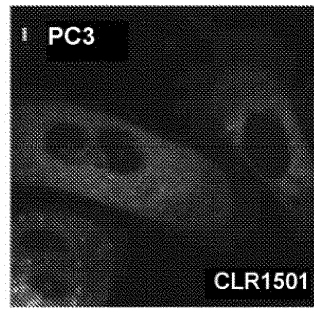
Фиг. 1F



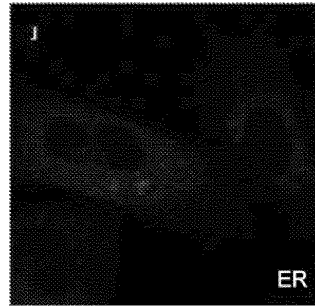
Фиг. 1G



Фиг. 1H



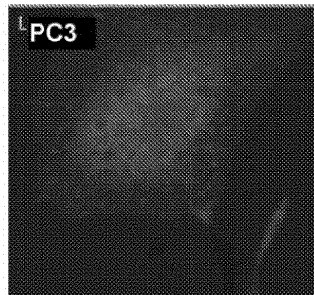
Фиг. 1I



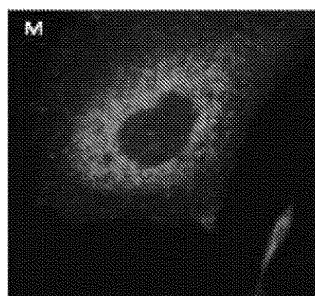
Фиг. 1J



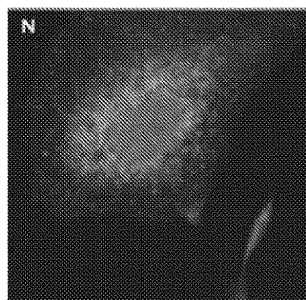
Фиг. 1K



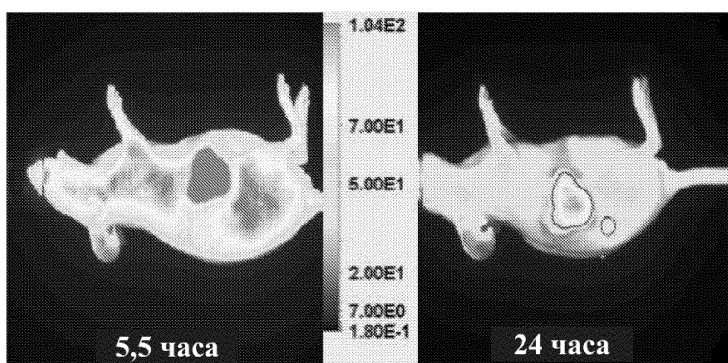
Фиг. 1L



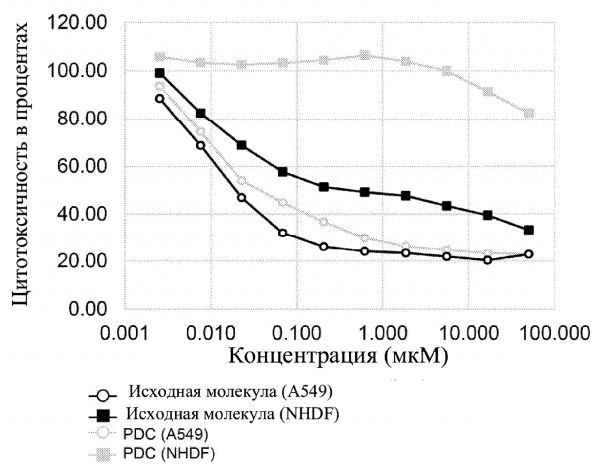
Фиг. 1M



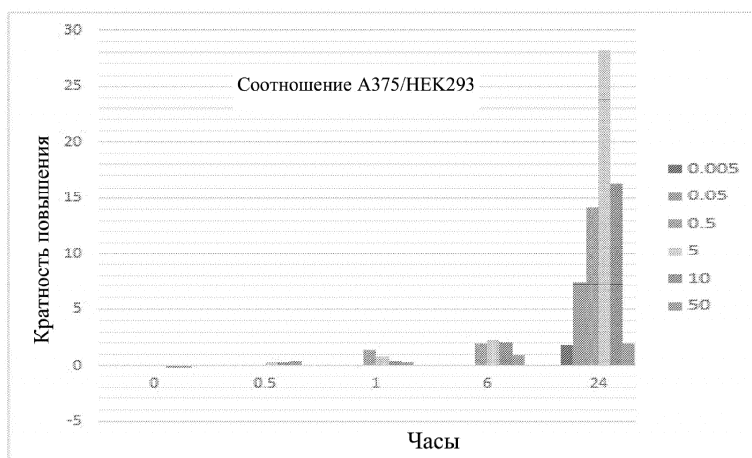
Фиг. 1N



Фиг. 2



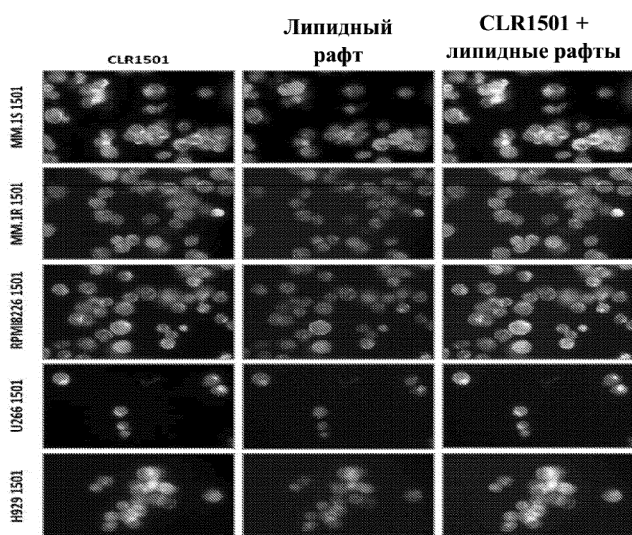
Фиг. 3



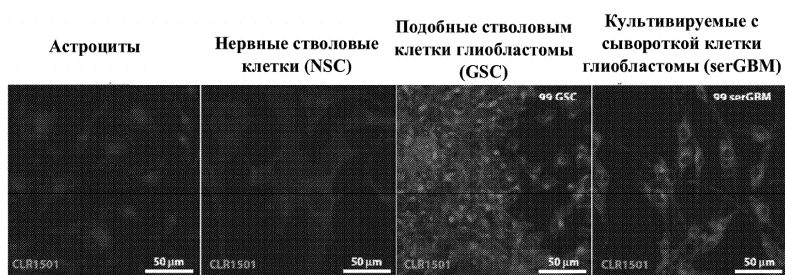
Фиг. 4



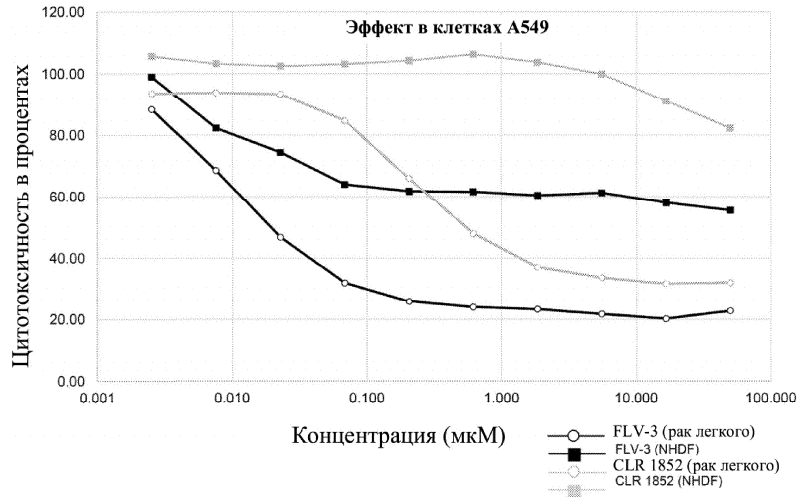
Фиг. 5



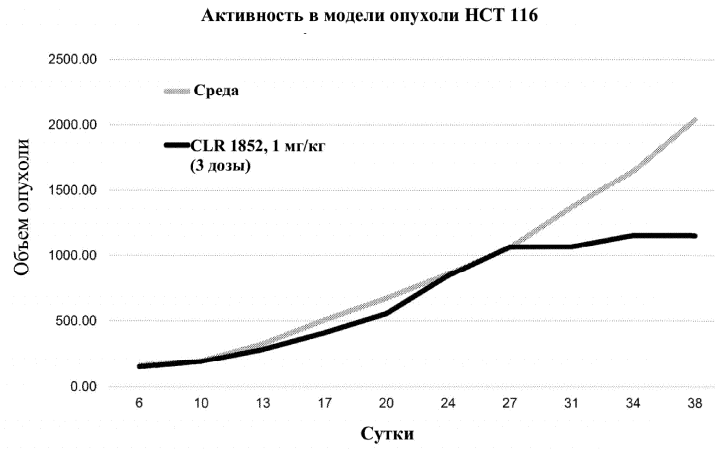
Фиг. 6



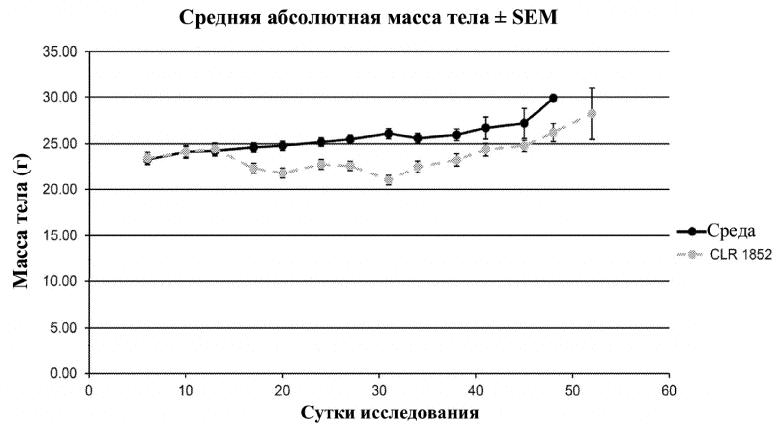
Фиг. 7



Фиг. 8

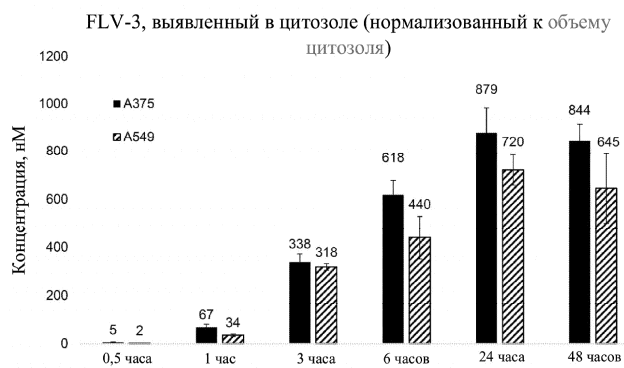


Фиг. 9



Фиг. 10





Фиг. 11

