

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391618 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.16

(51) Int. Cl. A61K 31/18 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.17

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА ГИАЛУРОНАНА

(31) 63/212,297

(72) Изобретатель:
Линь Хуа-Ян (TW)

(32) 2021.06.18

(33) US

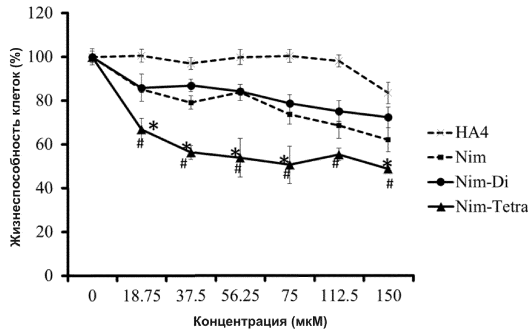
(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(86) PCT/US2022/034041

(87) WO 2022/266472 2022.12.22

(71) Заявитель:
АЙХОЛ КОРПОРЕЙШН (US)

(57) Настоящее изобретение относится к применению конъюгата гиалуронана (НА) для лечения рака. Также настоящее изобретение относится к применению конъюгата гиалуронана для лечения рака. Конъюгат гиалуронана представляет собой конъюгат нимесулид-НА, содержащий моносахаридную или от одной до четырех дисахаридных единиц гиалуроновой кислоты.



202391618 A1

202391618 A1

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЪЮГАТА ГИАЛУРОНАНА

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[01] 1. Область техники, к которой относится изобретение

[02] Настоящее изобретение относится к гиалуроновым конъюгатам; более конкретно, к гиалуроновым конъюгатам для лечения рака.

[03] 2. Описание предшествующего уровня техники

[04] Рак является одной из основных причин смерти во всем мире: в 2020 году на него пришлось почти 10 миллионов смертей. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, пятью наиболее распространенными новыми случаями рака в 2020 году были: рак молочной железы (2,26 миллиона случаев), рак лёгких (2,21 миллиона случаев), рак толстой и прямой кишки (1,93 миллиона случаев), рак предстательной железы (1,41 миллиона случаев) и рак кожи (немеланомный) (1,20 миллиона случаев). Наиболее частыми причинами смерти от рака в 2020 году были: рак лёгких (1,80 миллиона смертей), рак толстой и прямой кишки (935 000 смертей), рак печени (830 000 смертей), рак желудка (769 000 смертей) и рак молочной железы (685 000 смертей).

[05] В настоящее время существует четыре стандартных метода лечения рака: лучевая терапия, химиотерапия, хирургическая терапия и/или иммунотерапия; среди них хирургия и химиотерапия остаются наиболее распространенными средствами лечения рака. Определение целей лечения является важным первым шагом. Основная цель, как правило, состоит в том, чтобы вылечить рак или значительно продлить жизнь. Во многих случаях хирургическое вмешательство используется с целью полного удаления рака без значительного повреждения остального организма, но склонность рака к инвазии в соседние ткани или к распространению в отдаленные места за счет микроскопических метастазов часто ограничивает его эффективность. Химиотерапия представляет собой лечение рака цитотоксическими препаратами, способными разрушать раковые клетки. Однако в некоторых случаях раковые клетки развивают резистентность или становятся нечувствительными к одному или нескольким цитотоксическим препаратам, что делает эти препараты бесполезными для лечения рака. Кроме того, некоторые виды рака (например, рак легких) имеют плохой прогноз или нечувствительны к текущим химиотерапевтическим агентам. Следовательно, было предпринято множество попыток найти другие эффективные лекарственные средства или средства для успешного лечения рака, особенно рака, устойчивого к лекарственным средствам или нечувствительного к химиотерапевтическим средствам.

[06] Таким образом, в данной области техники существует потребность в агенте или соединении, которые могут быть полезны для лечения рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

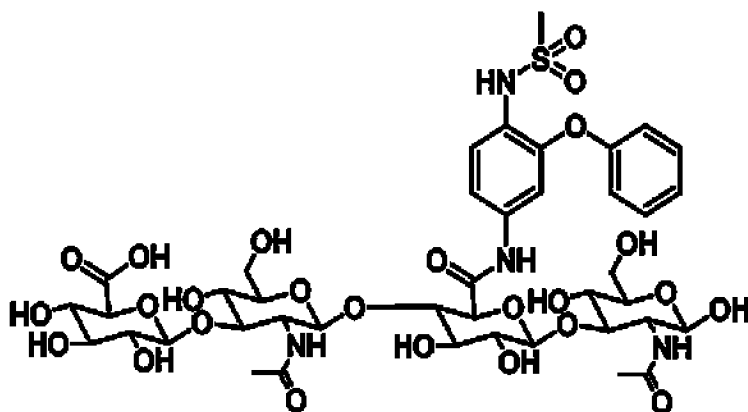
[07] Далее представлено упрощенное изложение сущности настоящего изобретения, чтобы дать читателю общее представление. Это краткое изложение сущности изобретения не является обширным обзором раскрытия, и оно не определяет ключевые/критические элементы настоящего изобретения или очерчивает объём настоящего изобретения. Его единственная цель состоит в том, чтобы представить некоторые концепции, раскрытые здесь, в упрощенной форме в качестве прелюдии к более подробному описанию, которое представлено позже.

[08] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта.

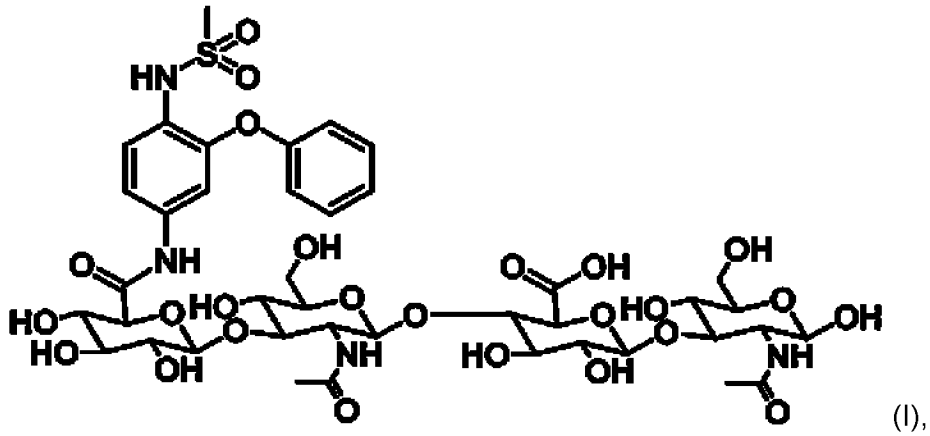
[09] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает в себя этап введения субъекту эффективного количества конъюгата гиалуронана, где конъюгат гиалуронана содержит гиалуроновую часть $(-4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-)_n$, где $n=1-4$, и замещающие группы (например, цитотоксическое лекарственное средство) могут быть присоединены к одной или нескольким карбоксильным группам D-глюкуроновой кислоты (4GlcUA).

[010] В некоторых других вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана содержит гиалуроновую часть $3\text{GlcNAc}\beta 1-(4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-)_n$ или $(4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-)_n-4\text{GlcUA}\beta 1$, где $n=1-4$, и замещающие группы (например, цитотоксическое лекарственное средство) могут быть присоединены к одной или нескольким карбоксильным группам D-глюкуроновой кислоты (4GlcUA).

[011] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения способ включает в себя этап введения субъекту эффективного количества конъюгата гиалуронана, где конъюгат гиалуронана содержит только две дисахаридные единицы и имеет структуру:

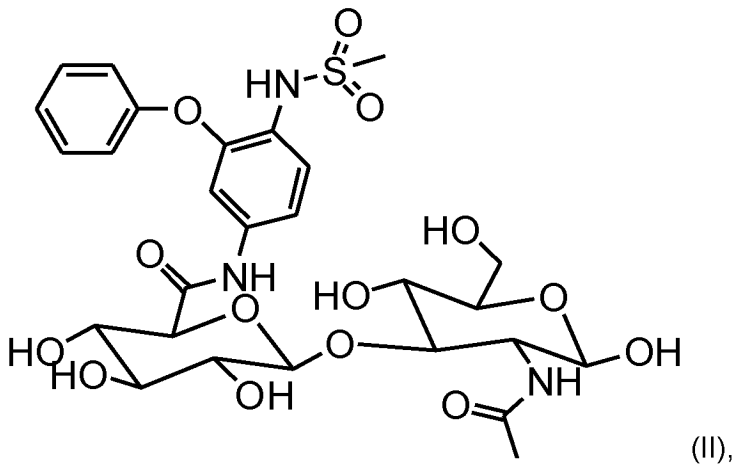


или



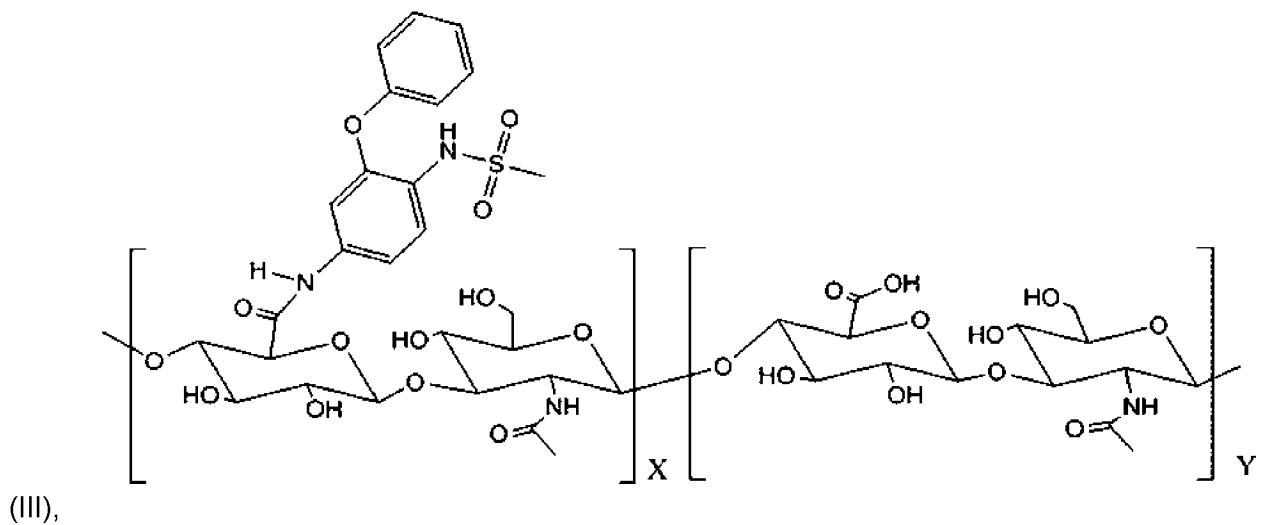
или его фармацевтически приемлемой соли.

[012] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

[013] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

[014] В различных вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее, включая человека.

[015] В соответствии с некоторыми вариантам осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак молочной железы, рак лёгких или колоректальный рак. Например, рак лёгких может быть немелкоклеточным раком лёгких (например, плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома и крупноклеточная карцинома) или мелкоклеточным раком лёгких.

[016] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции.

[017] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения рака.

[018] В соответствии с некоторыми вариантам осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит эффективное количество конъюгата гиалуронана, как описано выше, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[019] Объекты, которые также включены в другие аспекты настоящего изобретения, включают в себя применение конъюгата гиалуронана для получения лекарственного средства для лечения рака, а также конъюгат гиалуронана для применения при лечении рака.

[020] Многие из сопутствующих признаков и преимуществ настоящего изобретения станут лучше понятны со ссылкой на следующее подробное описание, рассматриваемое в связи с прилагаемыми чертежами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[021] Настоящее описание будет лучше понятно из следующего подробного описания, прочитанного в свете прилагаемых чертежей, где:

[022] Фиг. 1 представляет собой линейный график, показывающий цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов НА для клеточной линии A549 (*: $p < 0,05$ по сравнению с Nim; #: $p < 0,05$ по сравнению с НА4).

[023] Фиг. 2 представляет собой линейный график, показывающий цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов НА для клеточной линии MDA-MB-231 (*: $p < 0,05$ по сравнению с Nim; #: $p < 0,05$ по сравнению с НА4).

[024] Фиг. 3 представляет собой линейный график, показывающий цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов НА для клеточной линии HT-29 (*: $p < 0,05$ по сравнению с Nim; #: $p < 0,05$ по сравнению с НА4).

ОПИСАНИЕ

[025] Подробное описание, представленное ниже вместе с прилагаемыми чертежами, предназначено для описания настоящих примеров и не предназначено для представления единственных форм, в которых может быть осуществлен или использован настоящий пример. В описании изложены функции примера и последовательность этапов

для осуществления и эксплуатации примера. Однако одни и те же или эквивалентные функции и последовательности могут быть выполнены с помощью различных примеров.

[026] Для удобства здесь собраны некоторые термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если иное не определено здесь, то научные и технические термины, используемые в настоящем изобретении, должны иметь значения, обычно понятные и используемые специалистом в данной области техники.

[027] Если иное не требуется по контексту, то следует понимать, что термины в единственном числе должны включать формы того же объекта во множественном числе, а термины во множественном числе должны включать в себя термины в единственном числе. Кроме того, используемые здесь и в формуле изобретения термины «по меньшей мере, один» и «один или более» имеют одинаковое значение и включают в себя один, два, три или более. Кроме того, термины «по меньшей мере, один из А, В и С», «по меньшей мере, один из А, В или С» и «по меньшей мере, один из А, В и/или С», используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, предназначены для охвата только А, только В, только С, А и В вместе, В и С вместе, А и С вместе, а также А, В и С вместе.

[028] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объём изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены максимально точно. Однако любое числовое значение по своей сути содержит определенные ошибки, обязательно возникающие из-за стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующих контрольных измерениях. Кроме того, используемый здесь термин «примерно» обычно означает в пределах 10%, 5%, 1% или 0,5% от заданного значения или диапазона. В качестве альтернативы, термин «примерно» означает в пределах допустимой стандартной ошибки среднего значения при рассмотрении специалистом в данной области техники. За исключением эксплуатационных/рабочих примеров или если не указано иное, все числовые диапазоны, количества, значения и проценты, такие как количества материалов, продолжительность времени, температуры, рабочие условия, отношения количеств и подобные им, раскрытые здесь, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «примерно». Соответственно, если не указано иное, то числовые параметры, изложенные в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться по желанию. По крайней мере, каждый числовой параметр следует толковать с учетом количества сообщаемых значащих цифр и с применением обычных методов округления. Диапазоны могут быть выражены здесь как от одной конечной точки до другой конечной точки или между двумя конечными точками. Все раскрытые здесь диапазоны включают в себя конечные точки, если не указано иное.

[029] Используемые здесь термины «лечение» и «лечить» могут относиться к превентивной (например, профилактической), лечебной или паллиативной мере. В частности, используемый здесь термин «лечение» относится к применению или введению настоящего конъюгата гиалуронана или содержащей его фармацевтической композиции субъекту, который имеет патологическое состояние, симптом, связанный с этим патологическим состоянием, заболевание или расстройство, вторичное по отношению к этому патологическому состоянию, или предрасположенность к этому патологическому состоянию, с целью частичного или полного смягчения, купирования, облегчения, отсрочки начала, торможения прогрессирования, уменьшения тяжести и/или снижения частоты возникновения одного или нескольких симптомов или признаков указанного конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния, с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[030] Термины «субъект» и «пациент» используются здесь взаимозаменяемо и предназначены для обозначения животного, включая человека, которое подлежит лечению с помощью описанного здесь конъюгата гиалуронана, содержащих его фармацевтических композиций и/или способов настоящего изобретения. Соответственно, термин «субъект» или «пациент» включает в себя любое млекопитающее, для которого настоящее изобретение может быть полезным. Термин «млекопитающее» относится ко всем членам класса Mammalia, включая человека, приматов, домашних и сельскохозяйственных животных, таких как кролик, свинья, овца и крупный рогатый скот; а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных; и грызунов, таких как мыши и крысы. Термин «млекопитающее, отличное от человека» относится ко всем членам класса млекопитающих, кроме человека. В одном иллюстративном варианте осуществления изобретения пациентом является человек. Термины «субъект» или «пациент» предназначены для обозначения как мужского, так и женского пола, если конкретно не указан один пол.

[031] Термины «применение» и «введение» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения применения конъюгата гиалуронана или фармацевтической композиции настоящего изобретения к нуждающемуся в лечении субъекту.

[032] Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к количеству настоящего конъюгата гиалуронана, достаточному для получения желаемого терапевтического ответа. Эффективное количество агента не требуется для излечения заболевания или состояния, но обеспечивает лечение заболевания или состояния таким образом, что начало заболевания или состояния отсрочивается, тормозится или предотвращается, или симптомы заболевания или состояния ослабевают. Эффективное

количество можно разделить на одну, две или более доз в подходящей форме для введения один, два или более раз в течение определенного периода времени. Конкретное эффективное или достаточное количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подлежащее лечению, физическое состояние пациента (например, масса тела пациента, возраст или пол), тип подлежащего лечению млекопитающего или животного, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретные используемые составы и структуры соединений или их производных. Эффективное количество может быть выражено, например, как общая масса конъюгата гиалуронана или эквивалентная масса 4-аминонимулида в конъюгате гиалуронана (например, в граммах, миллиграммах или микрограммах) или отношение массы конъюгата гиалуронана или эквивалентной массы 4-аминонимезулида в конъюгате гиалуронана к массе тела, например, в миллиграммах на килограмм (мг/кг).

[033] Кроме того, согласно приведенным ниже примерам, конъюгат гиалуронана вводят путем внутривенной инъекции; однако это только иллюстрация того, как может быть реализовано настоящее изобретение, и настоящее изобретение не ограничивается этим.

[034] Например, конъюгат гиалуронана может быть включен вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом в фармацевтическую композицию, подходящую для желаемого способа введения. Некоторые фармацевтические композиции, полученные в соответствии с раскрытой и заявленной здесь концепцией (концепциями) изобретения, представляют собой единичные лекарственные формы, подходящие для перорального, чрезслизистого (например, назального, подъязычного, вагинального, трансбуккального или ректального), парентерального (например, подкожного, внутривенного, болюсного, внутримышечного или внутриаириального), интравитреального или чрезкожного введения пациенту. Примеры дозированных лекарственных форм включают в себя без ограничений таблетки; капсуловидные таблетки; капсулы, такие как мягкие эластичные желатиновые капсулы; облатки; троше; пастилки; дисперсии; суппозитории; мази; катаплазмы (припарки); пасты; порошки; повязки; кремы; пластыри; растворы; патчи; аэрозоли (например, назальные спреи или ингаляторы); гели; жидкие лекарственные формы, подходящие для перорального введения или введения через слизистую оболочку пациента, включая суспензии (например, водные или неводные жидкие суспензии, эмульсии масло-в-воде или жидкие эмульсии вода-в-масле), растворы и настойки; жидкие лекарственные формы, подходящие для парентерального введения пациенту; и стерильные твердые вещества (например, кристаллические или аморфные твердые вещества), которые могут быть восстановлены для получения жидких лекарственных форм, подходящих для

парентерального введения пациенту. Как можно понять, эти фармацевтические композиции также входят в объём настоящего изобретения.

[035] Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, носитель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке рассматриваемых агентов от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждое вспомогательное вещество должно быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата. Фармацевтическая композиция содержит соединение настоящего изобретения в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми ингредиентами. Вспомогательное вещество может быть в форме твердого, полутвердого или жидкого разбавителя, крема или капсулы. Эти фармацевтические препараты являются еще одним объектом изобретения. Обычно количество активных соединений составляет от 0,1 до 95% по массе препарата, предпочтительно от 0,2 до 20% по массе в препаратах для парентерального применения и предпочтительно от 1 до 50% по массе в препаратах для перорального введения. Для клинического применения способов настоящего изобретения фармацевтическую композицию настоящего изобретения готовят в виде составов, подходящих для предполагаемого пути введения.

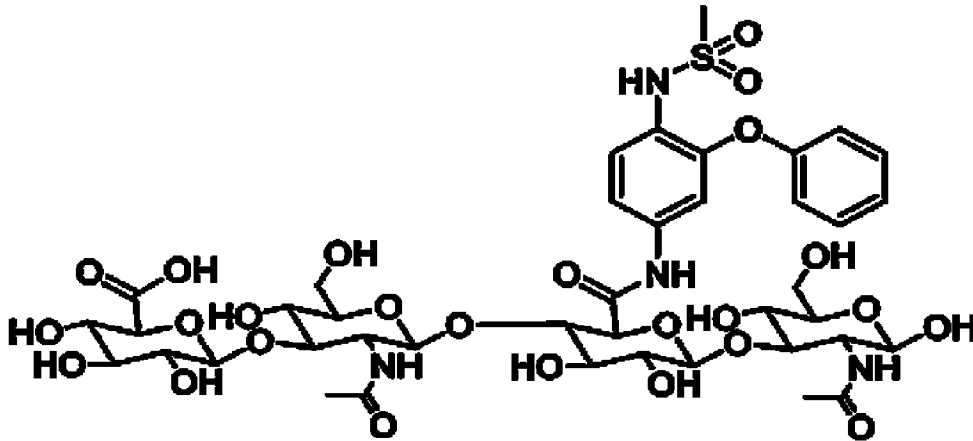
[036] Используемый здесь термин «гиалуроновая кислота» (HA) (также называемая гиалуронат или гиалуронан) представляет собой анионный несulfатированный гликозаминогликан, состоящий, по меньшей мере, из одной дисахаридной единицы, в частности, D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения HA состоит из двух дисахаридных звеньев (т.е. тетрасахарида HA). Термин «производное HA» относится к HA, имеющей любую модификацию гидроксильной, карбоксильной, амидной или ацетиламиногруппы одного или нескольких дисахаридных звеньев HA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения конъюгаты HA находятся в форме соли металла, предпочтительно соли щелочного металла и более предпочтительно соли натрия или калия.

[037] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения конъюгат гиалуронана содержит гиалуронановую часть (-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-)n, где n=1-4, и замещающие группы (т.е. цитотоксическое лекарственное средство) могут быть присоединены к одной или нескольким карбоксильным группам D-глюкуроновой кислоты (4GlcUA). Например, цитотоксическим препаратом является гидрогенизированный нимесулид.

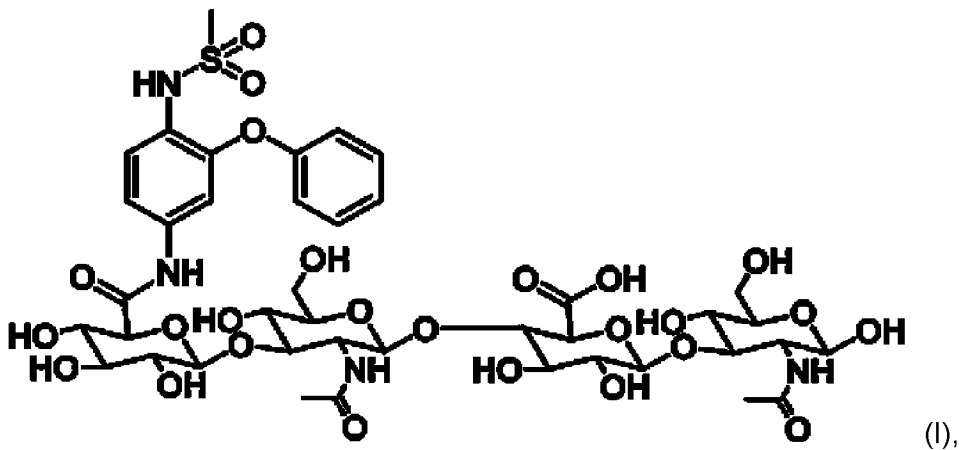
[038] В некоторых других вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана содержит гиалуронановую часть 3GlcNAc β 1-(4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-)n или

(4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1)- n -4GlcUA β 1, где $n=1-4$, и замещающие группы (т.е., цитотоксический препарат) может быть присоединен к одной или нескольким карбоксильным группам D-глюкуроновой кислоты (4GlcUA). Например, цитотоксическим препаратом является гидрогенизированный нимесулид.

[039] В частности, в некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана содержит только две дисахаридные единицы и имеет структуру:

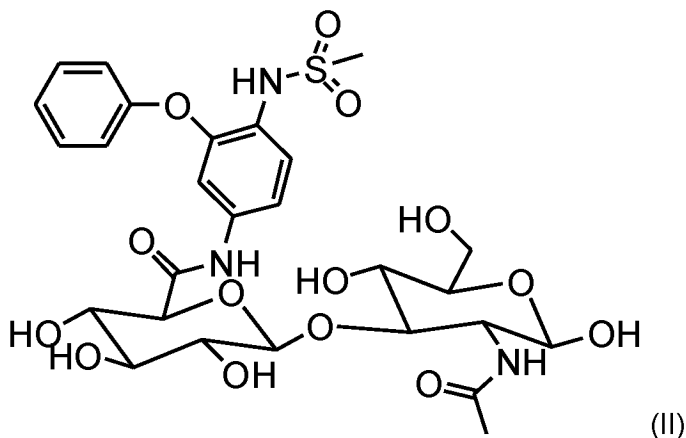


или



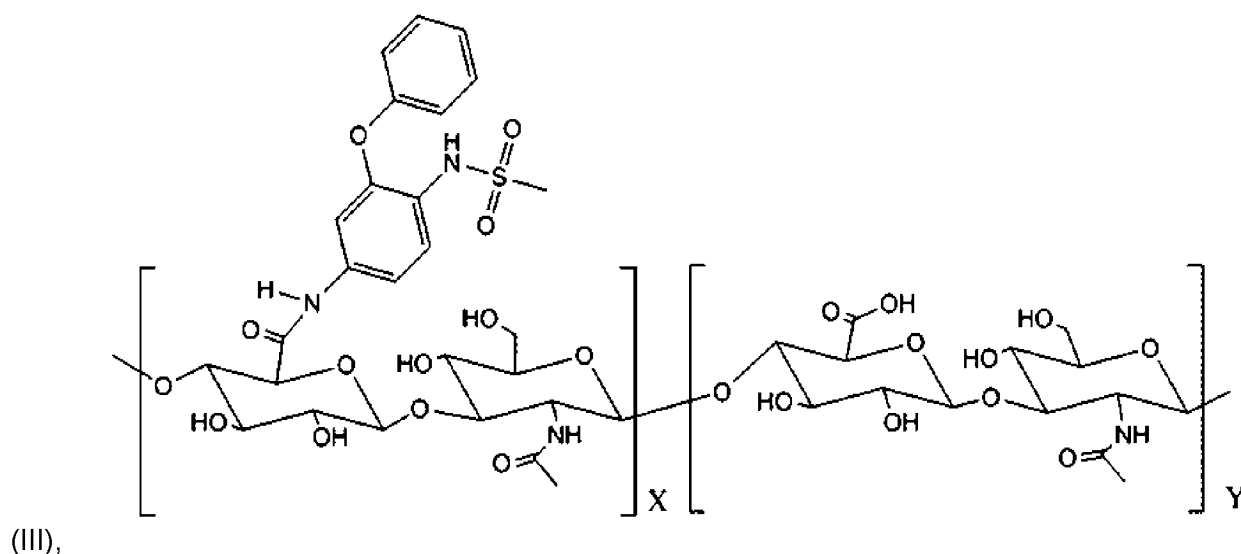
или их фармацевтически приемлемую соль.

[040] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или её фармацевтически приемлемую соль.

[041] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или её фармацевтически приемлемую соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

[042] Как можно оценить, когда гиалуроновая часть имеет более одной карбоксильной группы, «степень замещения (СЗ)» конъюгата НА (т.е. соотношение замещающих групп (т.е. гидрированного нимесулида), прикрепленных к одной карбоксильной группе части НА) может составлять от 20 до 100%. В частности, для конъюгата НА, имеющего гиалуроновую часть $(-4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-)_4$, если конъюгат НА имеет 1, 2, 3 или 4 замещающих группы, то СЗ будет составлять 25, 50, 75 или 100%, соответственно. В другом примере для конъюгата НА, содержащего гиалуроновую часть $(4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-)_4-4\text{GlcUA}\beta 1$, если конъюгат НА имеет 1, 2, 3, 4 или 5 замещающих групп, то СЗ будет составлять 20, 40, 60, 80 или 100%, соответственно.

[043] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично, на открытии того, что конъюгат нимесулид-НА-тетрасахарид (NIM-Tetra) проявляет неожиданно лучшую цитотоксичность для опухолевых клеток по отношению к определенным линиям раковых клеток по сравнению с нимесулидом отдельно или другими конъюгатами нимесулид-НА.

[044] Принимая во внимание вышеизложенное, настоящее изобретение относится к способам лечения рака, в частности рака молочной железы, рака лёгких и колоректального рака. Также настоящее изобретение относится к применению указанного конъюгата гиалуронана для лечения рака, а также его применение в получении лекарственного средства для указанной лечебной цели. Лекарственное средство (т.е. фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гиалуронана), конечно же, является объектом, охватываемым объёмом настоящей заявки.

[045] Следующие примеры представлены для пояснения некоторых аспектов настоящего изобретения и помощи специалистам в данной области техники при практическом применении этого изобретения. Эти примеры никоим образом не должны

рассматриваться как ограничивающие объём изобретения. Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области может, основываясь на приведенном здесь описании, использовать настоящее изобретение во всей его полноте.

[046] Пример 1

[047] Синтез и характеристика конъюгатов NIM-НА

[048] (1) Получение гидрированного нимесулида (H-NIM)

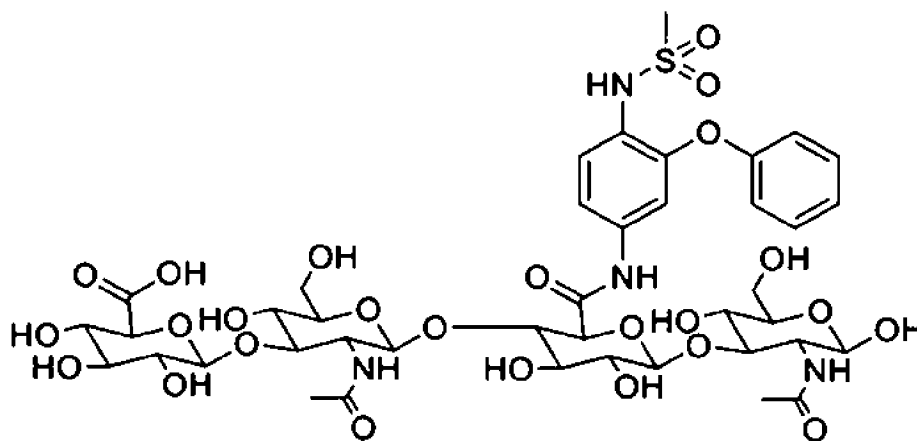
[049] Гидрированный нимесулид (N-(4-амино-2-феноксифенил)метансульфонамид или 4-аминонимесулид) синтезировали из коммерчески доступного нимесулида (N-(4-нитро-2-феноксифенил)метансульфонамида). В кратком изложении, 500 мг нимесулида полностью растворяли в 20 мл этилацетата, а затем в раствор добавляли 200 мг 5% Pd/C (палладий на углеводе) в качестве катализатора. Воздух удаляли из бутылки при постоянном перемешивании, и заменяли воздух газообразным водородом до 1 атм. с последующим перемешиванием в течение 24 часов с получением гидрированного нимесулида (H-NIM).

[050] Чистоту H-NIM определяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на предварительно покрытых пластинках ТСХ с силикагелем 60 F254 в УФ-свете с длиной волны 254 нм; подвижная фаза: гексан:этилацетат = 2:1.

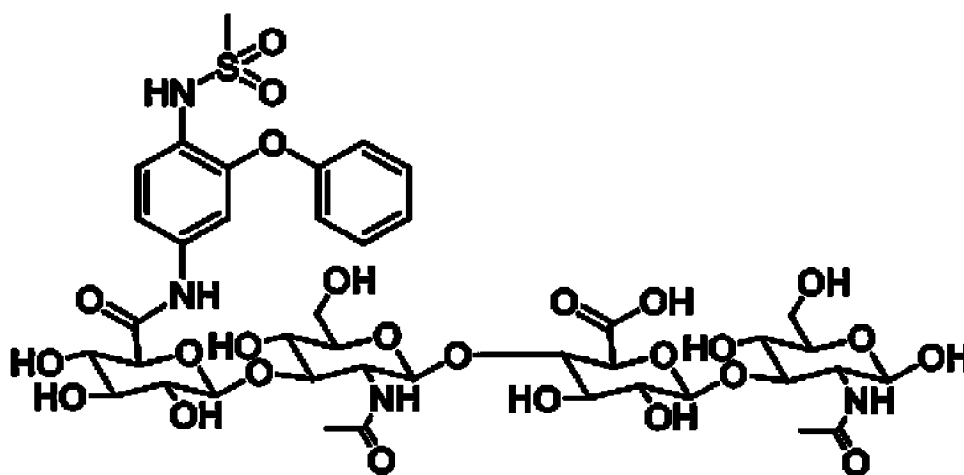
[051] Катализатор Pd/C удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали на роторном испарителе для удаления остаточного растворителя. Затем гидрированный продукт растворяли в растворе гексан-этилацетат (1:1) для дальнейшей очистки на колонке с силикагелем. Колонку элюировали элюирующим раствором (гексан-этилацетат = 1:1). Цветную фракцию собирали и лиофилизировали. Концентрацию и структуру полученного продукта подтверждали с помощью УФ и ЯМР, соответственно.

[052] (2) Синтез тетрасахаридного конъюгата NIM-НА

[053] Тетрасахарид НА (НА4), содержащий две дисахаридные единицы D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, подвергали взаимодействию с 4-аминонимесулидом (гидрогенизированным нимесулидом, H-NIM) с получением тетрасахаридного конъюгата NIM-НА (NIM-Tetra). В кратком изложении, 50 мг НА4 (0,06437 ммоль) растворяли в 3 мл DDW; затем к раствору НА4 добавляли 5 мл ДМСО. 9,1 мг Охута (0,06437 ммоль) растворяли в 0,5 мл ДМСО и затем добавляли к раствору НА4 при перемешивании в течение 6 минут; затем 17,9 мг H-NIM (0,07081 ммоль) растворяли в 0,5 мл ДМСО и добавляли к раствору НА4. 14 мкл DIC (0,09656 ммоль) растворяли в 0,5 мл ДМСО при перемешивании в течение 1 минуты и затем добавляли к раствору НА4. Конечную реакционную смесь перемешивали в течение 48 часов при комнатной температуре, полученный раствор лиофилизировали в течение трех дней, а разделение и очистку осуществляли с помощью препаративной ВЭЖХ (Waters 600) с колонкой Inertsil ODS-3. Синтезированный таким образом NIM-тетра имеет следующие структуры:



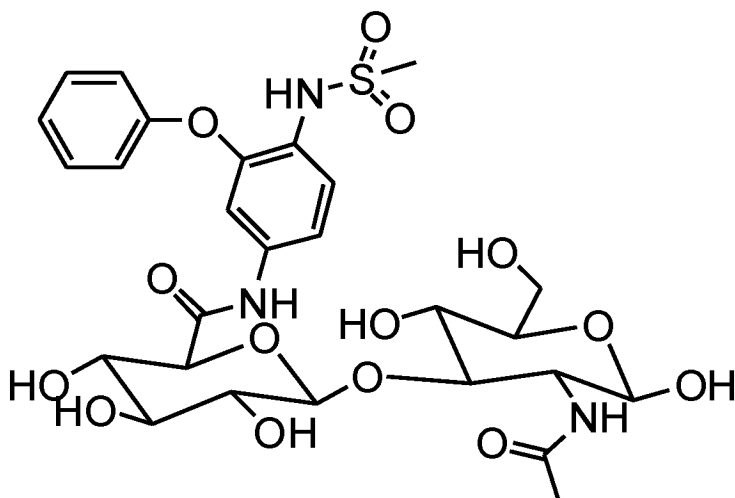
или



(I).

[054] (3) Синтез дисахаридного конъюгата NIM-НА

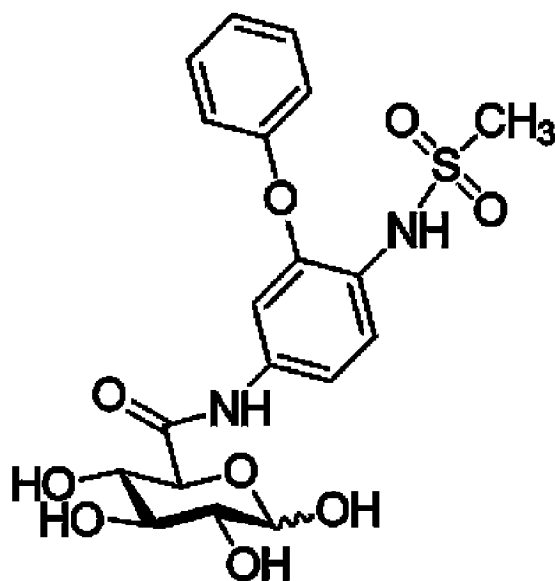
[055] Дисахарид НА, содержащий одно дисахаридное звено D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамин, подвергали взаимодействию с 4-аминонимесулидом (гидрогенизированным нимесулидом, Н-NIM) с получением дисахаридного конъюгата NIM-НА (NIM-Di), имеющего следующую структуру:



(II).

[056] (4) Синтез моносахаридного конъюгата NIM-НА

[057] В кратком изложении, глюкуроновую кислоту (194,14 Да) подвергали взаимодействию с 4-аминонимесулидом (гидрогенизированный нимесулид, Н-NIM) с получением моносахаридного конъюгата NIM-НА (454,4 Да) (NIM-Mono), имеющего следующую структуру:



(IV)

[058] Пример 2

[059] Цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов NIM-НА в отношении клеток MDA-MB-231

[060] В этом примере клетки MDA-MB-231 (линия клеток рака молочной железы человека) использовали для оценки цитотоксичности для опухолевых клеток различных конъюгатов NIM-НА.

[061] Клетки MDA-MB-231 в 100 мкл среды L-15 высевали с плотностью 5×10^3 на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали в течение ночи. На следующий день среду удаляли и заменяли свежей средой (конечная концентрация ДМСО: 0,8%), содержащей 0-150 мкМ нимесулида (NIM), NIM-Tetra, тетрасахарида НА или дисахаридных конъюгатов NIM-НА (NIM-Di), а затем планшеты инкубировали в течение 24 часов. Затем среду удаляли и добавляли 100 мкл среды с 10% раствора МТТ (исходный раствор МТТ: 5 мг/мл), а затем планшеты инкубировали при температуре 37°C в темноте в течение 4 часов. После этого среду осторожно отбирали, добавляли 200 мкл ДМСО и планшеты встряхивали в течение 10 минут, прежде чем считывать планшет при длине волны 570 нм.

[062] Результаты, обобщенные на Фигуре 1, показывают, что NIM-Tetra проявляет значительно лучшую цитотоксичность для опухолевых клеток в отношении клеток MDA-MB-231 по сравнению с только нимесулидом, одним только тетрасахаридом НА или дисахаридными конъюгатами NIM-НА (NIM-Di). Дисахарид NIM-НА (NIM-Di) также продемонстрировал сравнимую с Nim цитотоксичность для опухолевых клеток.

[063] Пример 3**[064] Цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов NIM-НА в отношении клеток A549**

[065] В этом примере клетки A549 (линия клеток рака лёгких человека) использовали для оценки цитотоксичности различных конъюгатов NIM-НА для опухолевых клеток.

[066] Клетки A549 в 100 мкл среды F-12K высевали с плотностью 3×10^3 на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали в течение ночи. На следующий день среду удаляли и заменяли свежей средой (конечная концентрация ДМСО: 0,8%), содержащей 0-150 мкМ нимесулида, NIM-Tetra, тетрасахарида НА или дисахаридных конъюгатов NIM-НА (NIM-Di), а затем планшеты инкубировали в течение 24 часов. Затем среду удаляли и добавляли 100 мкл среды с 10% раствора МТТ (исходный раствор МТТ: 5 мг/мл), а затем планшеты инкубировали при температуре 37°C в темноте в течение 4 часов. После этого среду осторожно отбирали, добавляли 200 мкл ДМСО и планшеты встряхивали в течение 10 минут, прежде чем считывать планшет при длине волны 570 нм.

[067] Результаты, обобщенные на Фигуре 2, показывают, что как NIM-Tetra, так и дисахаридные конъюгаты NIM-НА (NIM-Di) демонстрируют значительно лучшую цитотоксичность для опухолевых клеток в отношении клеток A549 по сравнению с только нимесулидом или только тетрасахаридом НА. Моносахарид NIM-НА (NIM-Mono) также продемонстрировал сравнимую с NIM цитотоксичность для опухолевых клеток. Дисахарид NIM-НА (NIM-Di) также показал лучшую цитотоксичность для опухолевых клеток, чем нимесулид.

[068] Пример 4**[069] Цитотоксичность для опухолевых клеток конъюгатов NIM-НА в отношении клеток HT-29**

[070] В этом примере клетки HT-29 (линия клеток колоректального рака человека) использовали для оценки цитотоксичности для опухолевых клеток различных конъюгатов NIM-НА.

[071] Клетки HT-29 в 100 мкл среды MyCoу's-5 высевали с плотностью 3×10^3 на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали в течение ночи. На следующий день среду удаляли и заменяли свежей средой (конечная концентрация ДМСО: 0,8%), содержащей 0-150 мкМ нимесулида (NIM), NIM-Tetra или тетрасахарида НА, а затем планшеты инкубировали в течение 24 часов. Затем среду удаляли и добавляли 100 мкл среды с 10% раствора МТТ (исходный раствор МТТ: 5 мг/мл), а затем планшеты инкубировали при температуре 37°C в темноте в течение 4 часов. После этого среду осторожно отбирали, добавляли 200 мкл ДМСО и планшеты встряхивали в течение 10 минут, прежде чем считывать планшет при длине волны 570 нм.

[072] Результаты, обобщенные на фиг. 3, показывают, что NIM-Tetra демонстрирует значительно лучшую цитотоксичность для опухолевых клеток в отношении клеток HT-29 по сравнению с только нимесулидом или только тетрасахаридом НА.

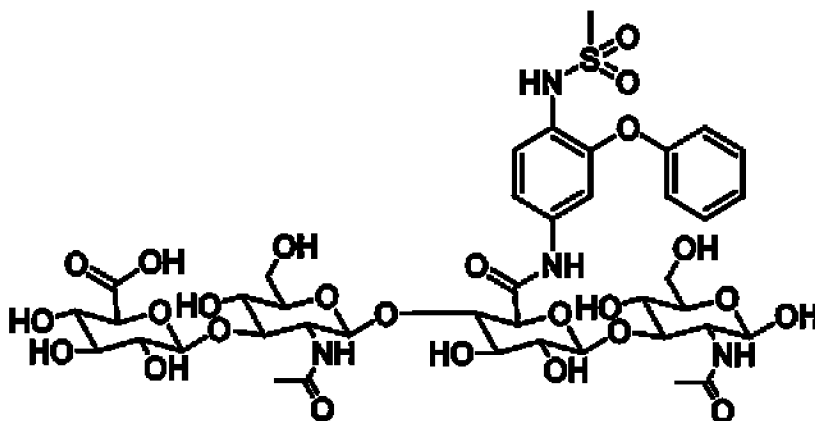
[073] В целом, результаты, представленные в Примерах 2-4 настоящего описания, показывают, что конъюгат NIM-Tetra настоящего изобретения проявляет желаемую цитотоксичность для опухолевых клеток в отношении нескольких видов рака, таких как рак молочной железы, рак лёгких и колоректальный рак. Дисахарид NIM-НА (NIM-Di) проявляет желаемую клеточную цитотоксичность при некоторых видах рака, таких как рак молочной железы, рак лёгких и колоректальный рак.

[074] Следует понимать, что приведенное выше описание вариантов осуществления изобретения дано только в качестве примера и что специалисты в данной области техники могут внести различные модификации. Приведенное выше описание, примеры и данные обеспечивают полное описание структуры и применения приведенных в качестве примера вариантов осуществления настоящего изобретения. Хотя различные варианты осуществления изобретения были описаны выше с определенной степенью детализации или со ссылкой на один или несколько отдельных вариантов осуществления изобретения, специалисты в данной области техники могут внести многочисленные изменения в раскрытые варианты осуществления изобретения, не выходя за рамки сущности или объёма настоящего изобретения.

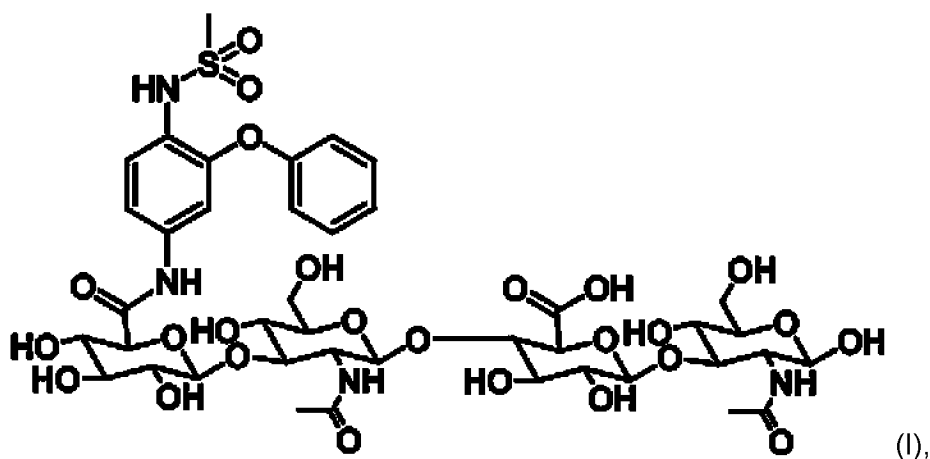
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ РСТ

1. Применение конъюгата гиалуронана при получении лекарственного средства для применения при лечении рака у нуждающегося в этом субъекта, где конъюгат гиалуронана содержит от одной до четырех дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, а также один или более гидрогенизированных нимесулидов, каждый из которых ковалентно связан с D-глюкуроновой кислотой одной из дисахаридных единиц.

2. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:

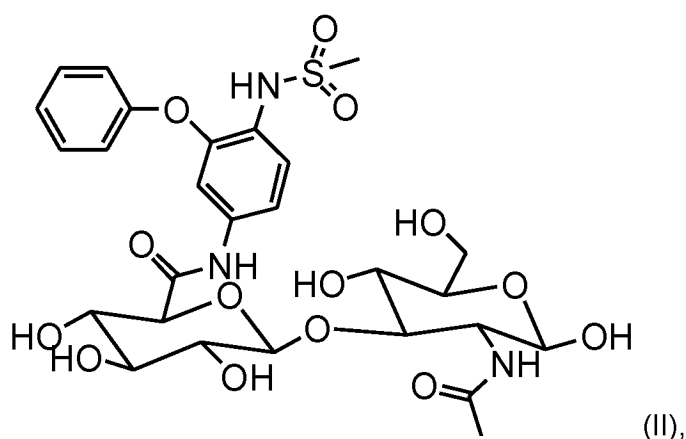


или



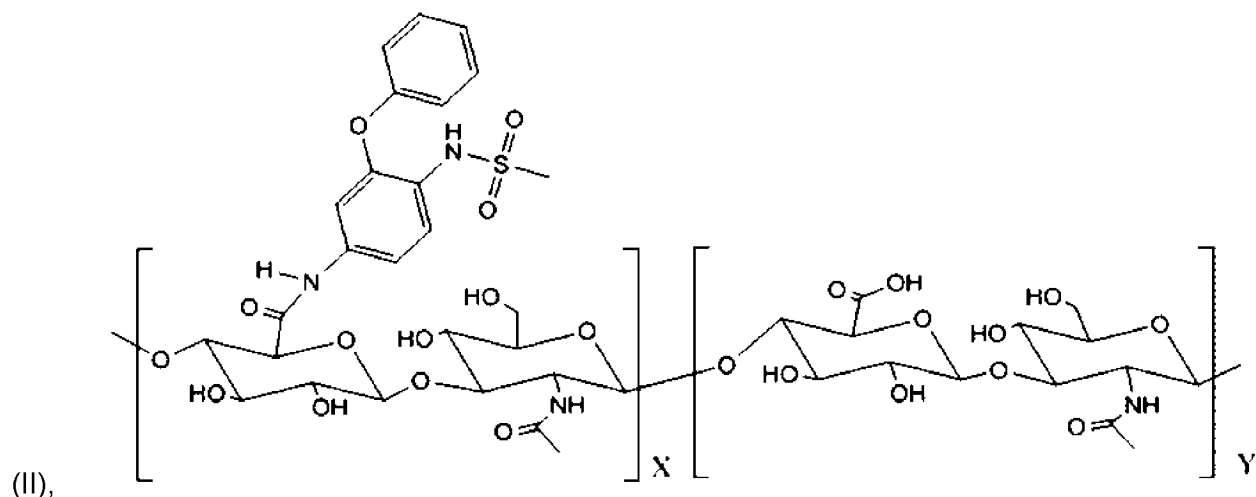
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

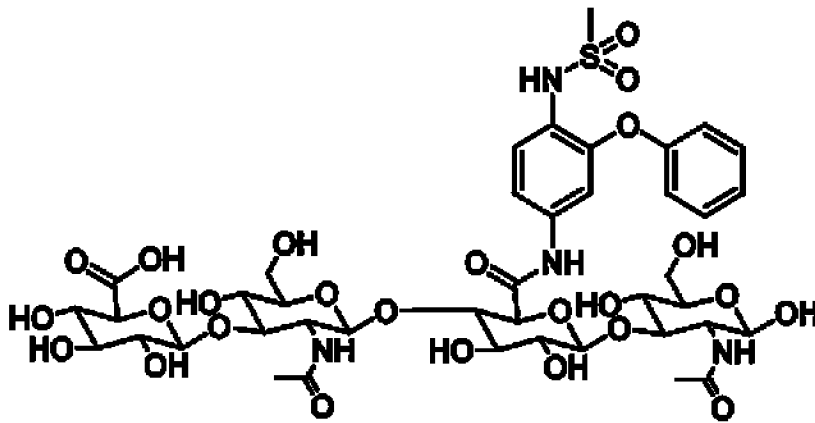
5. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где субъектом является человек.

6. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где рак представляет собой рак молочной железы, рак лёгких или колоректальный рак.

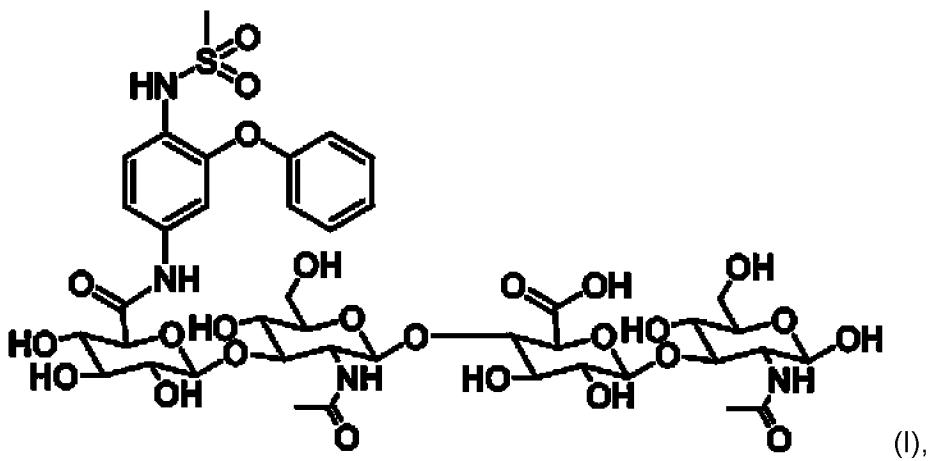
7. Применение конъюгата гиалуронана по п. 1, где степень замещения конъюгата гиалуронана составляет от 20 до 100%.

8. Конъюгат гиалуронана для применения при лечении рака у нуждающегося в этом субъекта, где конъюгата гиалуронана содержит от одной до четырех дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, а также один или более гидрогенизированных нимесулидов, каждый из которых ковалентно связан с D-глюкуроновой кислотой одной из дисахаридных единиц.

9. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:

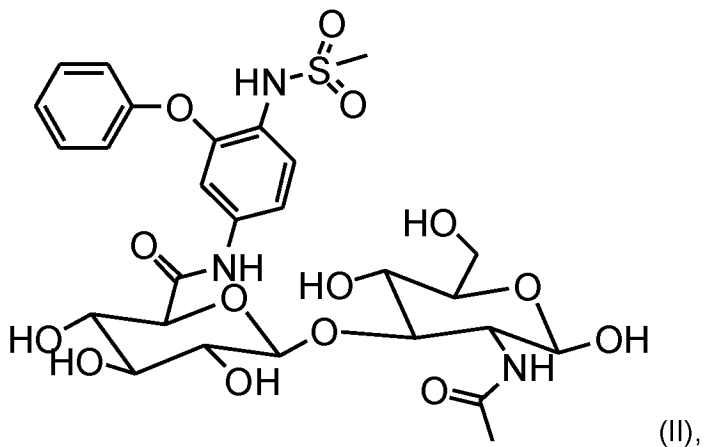


или



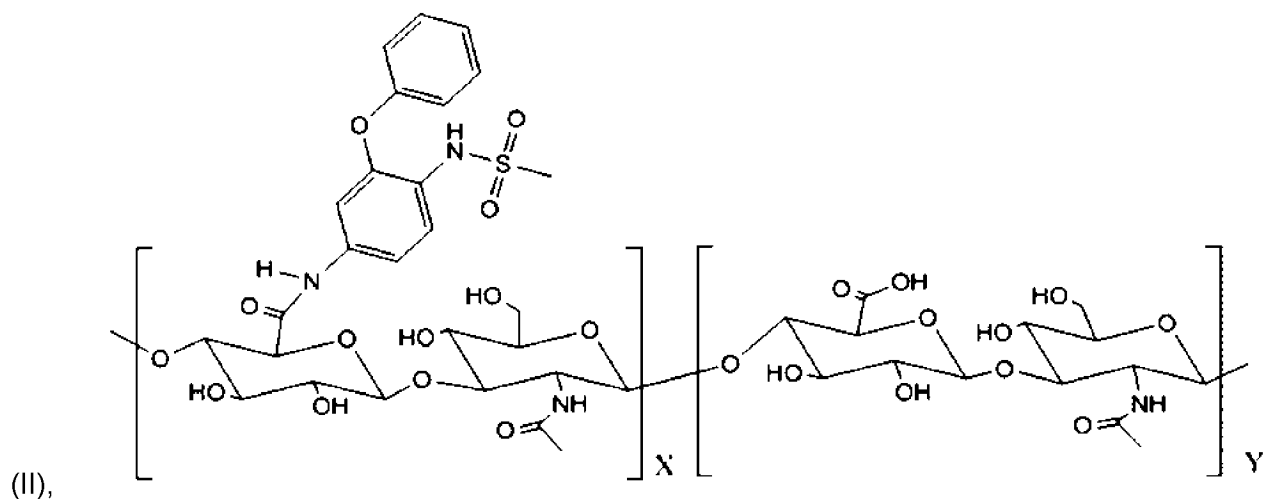
или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

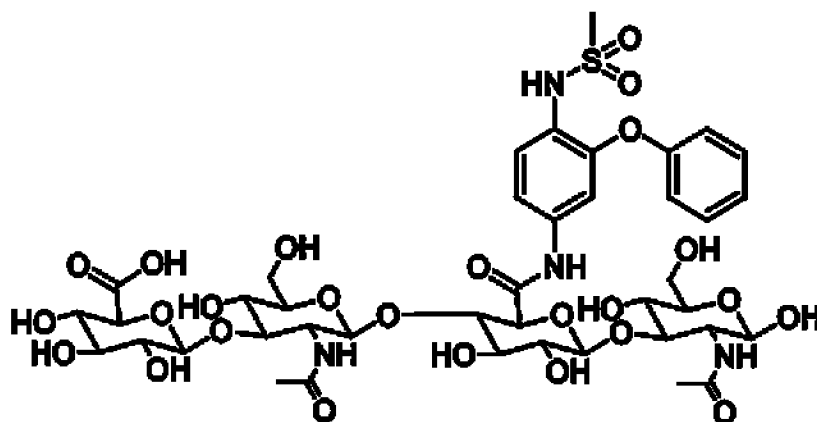
12. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где субъектом является человек.

13. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где рак представляет собой рак молочной железы, рак лёгких или колоректальный рак.

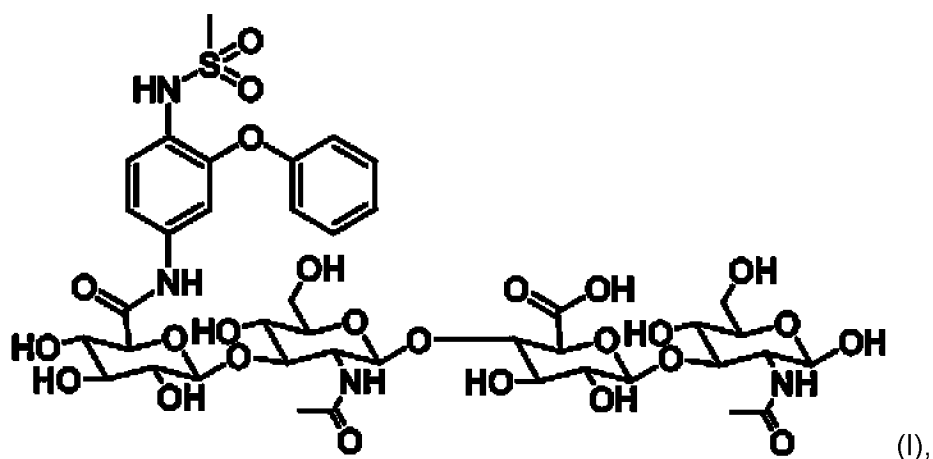
14. Конъюгат гиалуронана для применения по п. 8, где степень замещения конъюгата гиалуронана составляет от 20 до 100%.

15. Фармацевтическая композиция для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, содержащая эффективное количество конъюгата гиалуронана и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где конъюгат гиалуронана содержит от одной до четырех дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, и один или несколько гидрогенизированных нимесулидов, каждый из которых ковалентно связан с D-глюкуроновой кислотой одной из дисахаридных единиц.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:

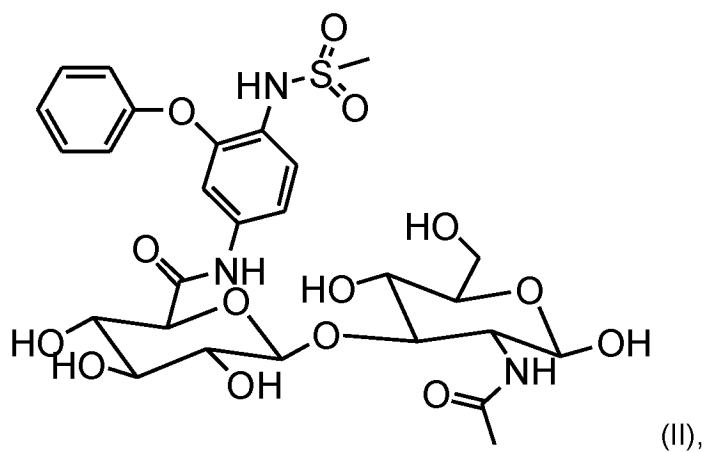


или



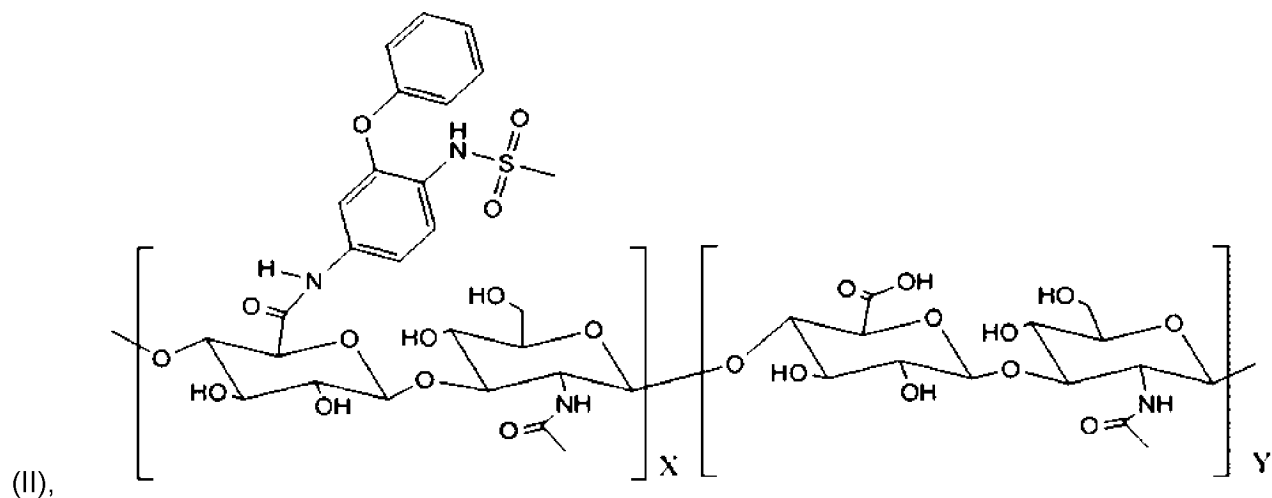
или его фармацевтически приемлемая соль.

17. Фармацевтическая композиция по п. 15, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

18. Фармацевтическая композиция по п. 15, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

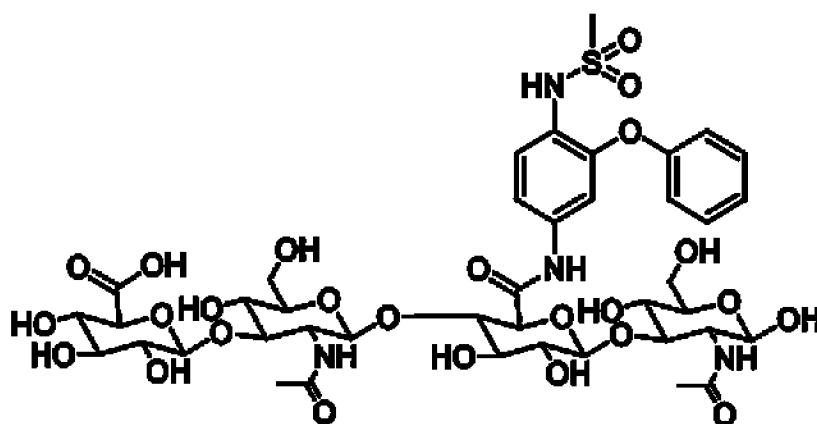
19. Фармацевтическая композиция по п. 15, где субъектом является человек.

20. Фармацевтическая композиция по п. 15, где рак представляет собой рак молочной железы, рак лёгких или колоректальный рак.

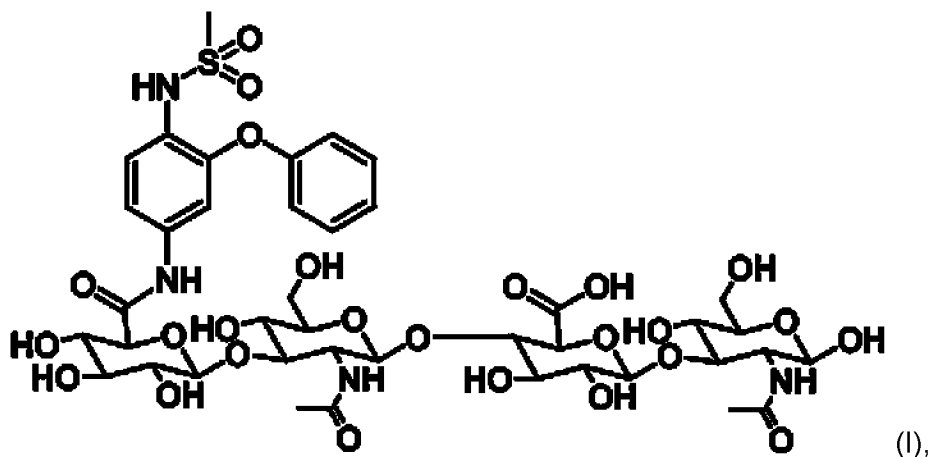
21. Фармацевтическая композиция по п. 15, где степень замещения конъюгата гиалуронана составляет от 20 до 100%.

22. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя этап введения субъекту эффективного количества конъюгата гиалуронана, где конъюгат гиалуронана содержит от одной до четырех дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, и один или несколько гидрогенизированных нимесулидов, каждый из которых ковалентно связан с D-глюкуроновой кислотой одной из дисахаридных единиц.

23. Способ по п. 22, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:

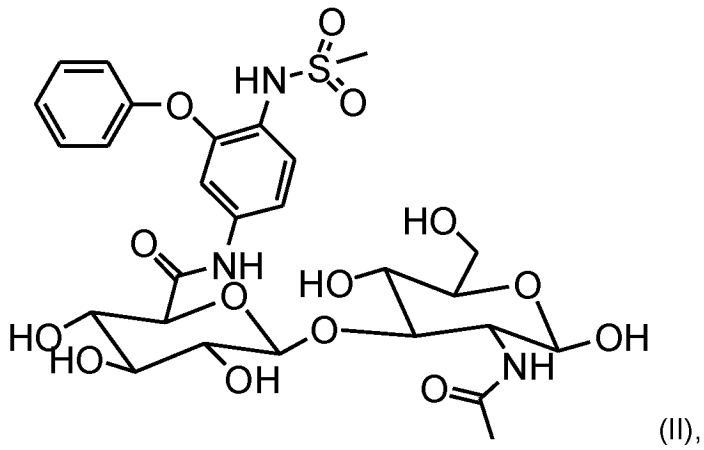


или



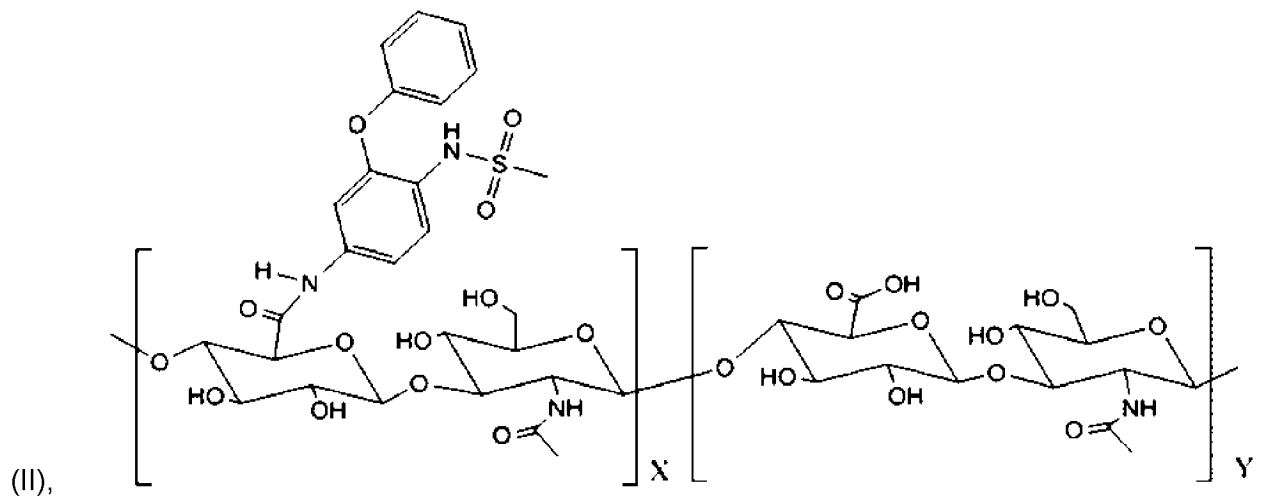
или его фармацевтически приемлемая соль.

24. Способ по п. 22, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

25. Способ по п. 22, где конъюгат гиалуронана имеет структуру:

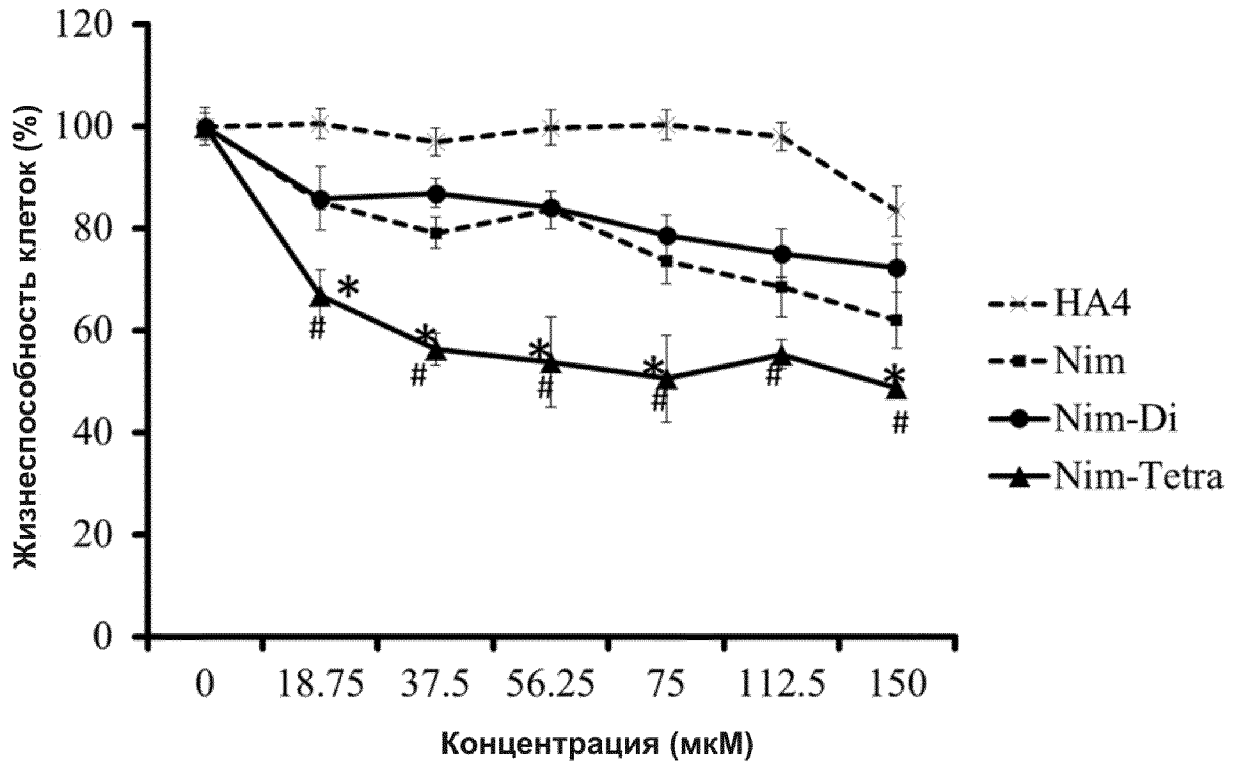


или его фармацевтически приемлемая соль, где X равно 1, а Y равно 0, 1, 2 или 3.

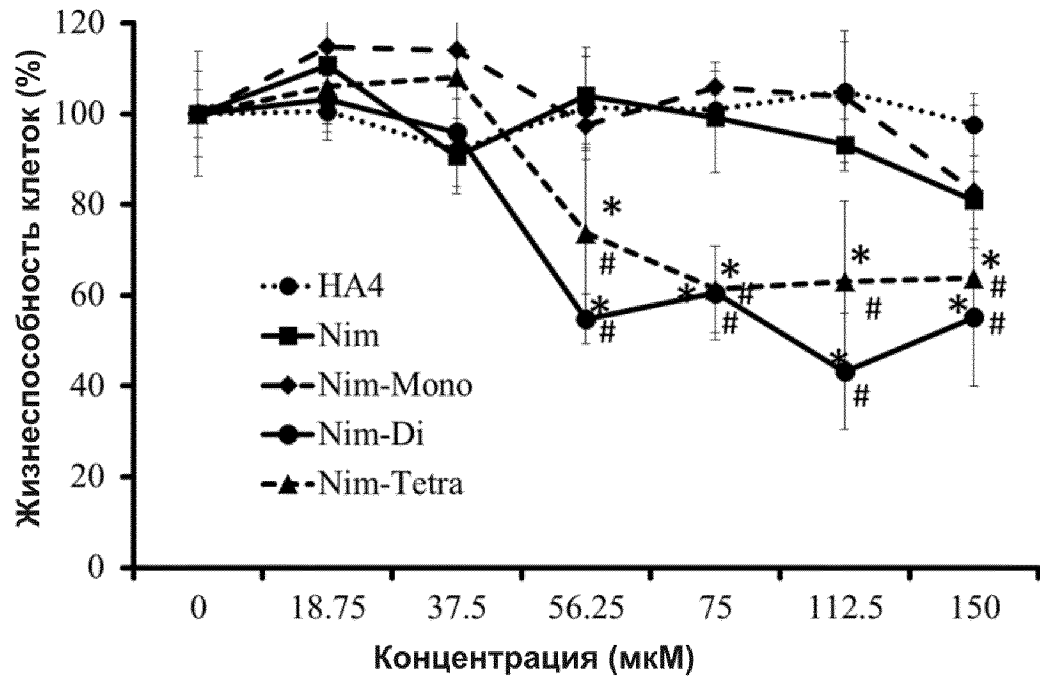
26. Способ по п. 22, отличающийся тем, что субъектом является человек.

27. Способ по п. 22, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы, рак лёгких или колоректальный рак.

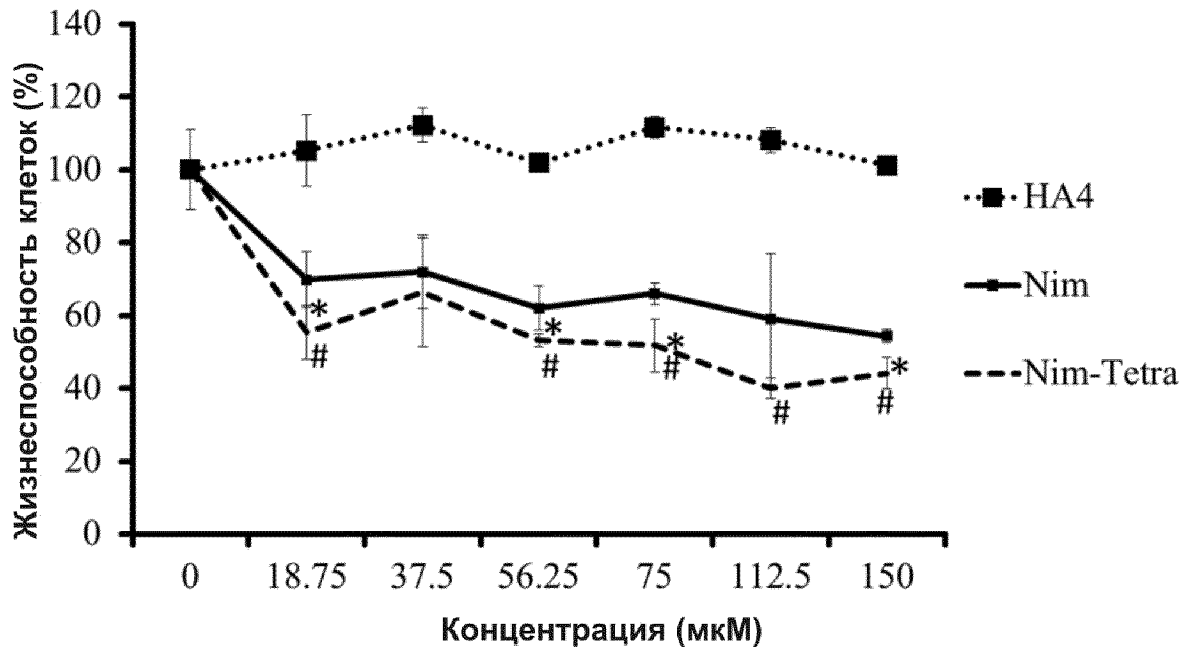
28. Способ по п. 22, отличающийся тем, что степень замещения конъюгата гиалуронана составляет от 20 до 100%.



Фиг. 1



Фиг. 2



ФИГ. 3