

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992044** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.01.09

(22) Дата подачи заявки
2015.09.02

(51) Int. Cl. *C07D 487/04* (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61K 31/5513 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 7/02 (2006.01)

(54) **ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ**

(31) 62/045,248; 62/087,040; 62/149,370;
62/164,305

(32) 2014.09.03; 2014.12.03; 2015.04.17;
2015.05.20

(33) US

(62) 201790446; 2015.09.02

(71) Заявитель:
ИММУНОДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чари Рави В. Дж., Миллер Майкл
Луис, Шизука Манами (US)

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

(57) Изобретение относится к новым бензодиазепиновым производным, обладающим антипролиферативной активностью, более конкретно к новым бензодиазепиновым соединениям формул (I)-(VI). Изобретение также предлагает конъюгаты бензодиазепиновых соединений, присоединенных к связывающемуся с клетками агенту. Кроме того, изобретение предлагает композиции и способы, пригодные для угнетения аномального роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего с использованием соединений или конъюгатов по изобретению.

A2

201992044

201992044

A2

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Настоящая заявка испрашивает приоритет по дате подачи согласно 35 разделу Кодекса законов США, §119(e), предварительной заявки США № 62/045,248, поданной 3 сентября 2014 г., предварительной заявки США № 62/087,040, поданной 3 декабря 2014 г., предварительной заявки США № 62/149,370, поданной 17 апреля 2015 г., и предварительной заявки США № 62/164,305, поданной 20 мая 2015 г., полное содержание которых, включая все изображения, формулы, описания и пункты патентной формулы, включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[02] Настоящее изобретение относится к новым цитотоксическим соединениям, а также цитотоксическим конъюгатам, включающим эти цитотоксические соединения и связывающиеся с клетками агенты. Более конкретно настоящее изобретение относится к новым бензодиазепиновым соединениям, их производным, их промежуточным соединениям, их конъюгатам и фармацевтически приемлемым солям, которые пригодны в качестве лекарственных средств, в частности антипролиферативных агентов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[03] Бензодиазепиновые производные пригодны для лечения различных расстройств и включают такие лекарственные средства, как противоэпилептические вещества (имидазо[2,1-b][1,3,5]бензотиадиазепины, патент США № 4444688; патент США № 4062852), антибактериальные вещества (пиримидо[1,2-c][1,3,5]бензотиадиазепины, GB 1476684), диуретики и гипотензивные средства (пирроло(1,2-b)[1,2,5]бензотиадиазепин 5,5 диоксид, патент США № 3506646), гиполипидемические средства (WO 03091232), антидепрессанты (патент США № 3453266); средства против остеопороза (JP 2138272).

[04] На животных моделях опухолей было показано, что бензодиазепиновые производные, такие как пирролобензодиазепины (ПБД), действуют как противоопухолевые агенты (замещенный N-2-имидазолил-алкилом 1,2,5-бензотиадиазепин-1,1-диоксид, патент США № 6156746), бензо-пиридо или дипиридотиадиазепин (WO 2004/069843), пирроло[1,2-b][1,2,5] бензотиадиазепины и производные пирроло[1,2-b][1,2,5]бензодиазепина (WO2007/015280), производные томаимицина (*напр.*, пирроло[1,4]бензодиазепины), такие, как описано в WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930 и EP 2019104. Также известно, что бензодиазепины влияют на рост и дифференциацию клеток (Kamal A., *и др.*, Bioorg Med Chem. 2008 Aug 15;16(16):7804-10

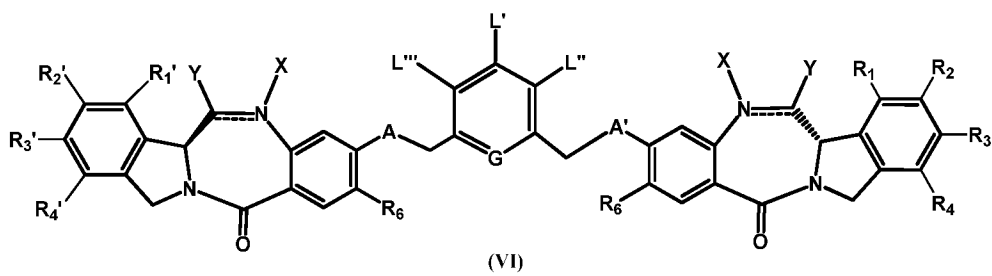
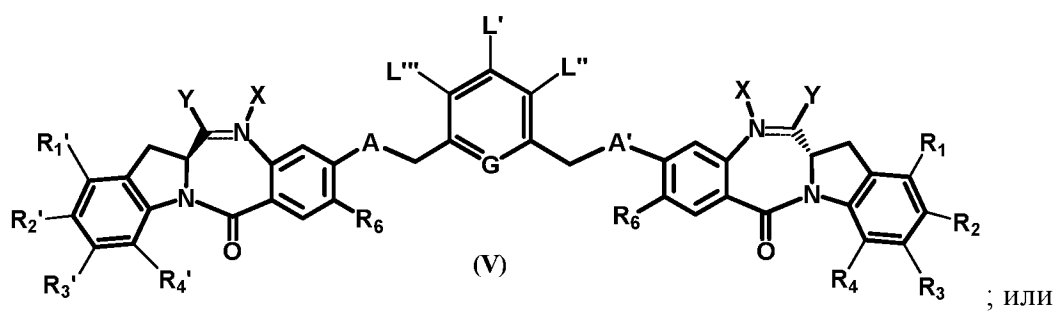
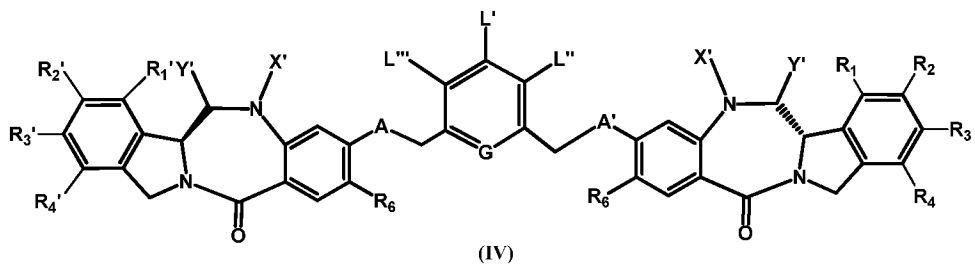
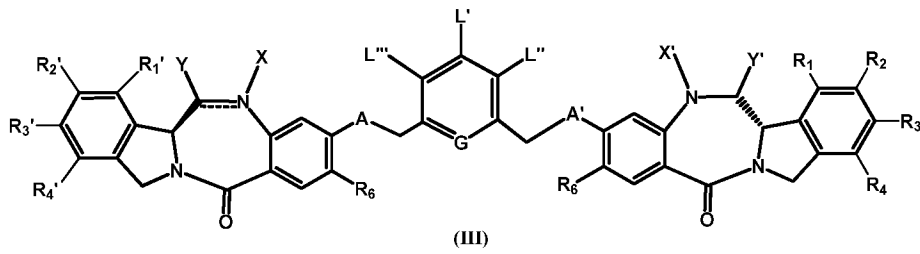
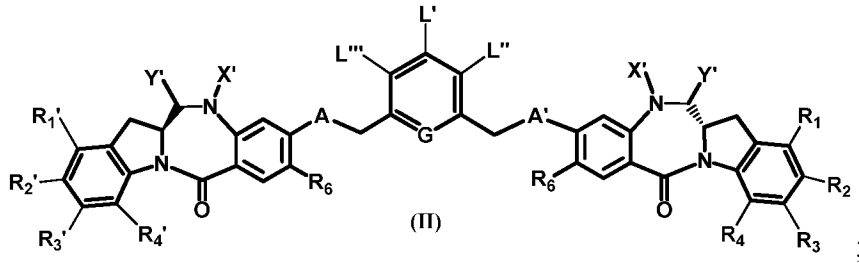
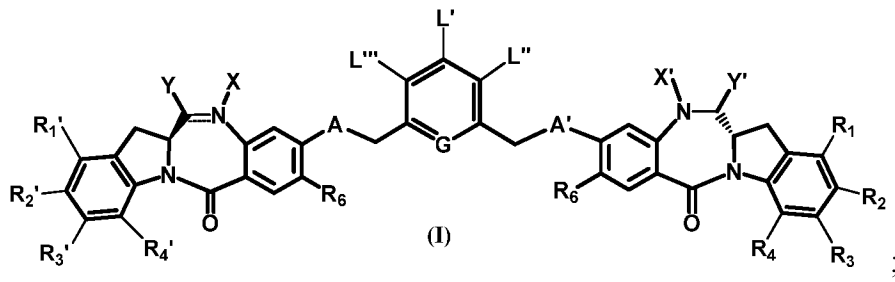
(и процитированные в нем ссылки); Kumar R, *Mini Rev Med Chem.* 2003 Jun; 3(4):323-39 (и процитированные в нем ссылки); Bednarski J J, *и др.*, 2004; Sutter A. P, *и др.*, 2002; Blatt N B, *и др.*, 2002), Kamal A. *и др.*, *Current Med. Chem.*, 2002; 2; 215-254, Wang J-J., *J. Med. Chem.*, 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *и др.*, *Cancer Res.* 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., *Cancer Res* 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. и Bose D.S., *Chem Rev* 1994; 94:433-465; и Tozuka, Z., *и др.*, *Journal of Antibiotics*, (1983) 36; 1699-1708. Общая структура ПБД описана в публикации заявки на патент США № 20070072846. ПБД отличаются количеством, типом и положением заместителей в ароматических А-кольцах и пиррольных С-кольцах, а также степенью насыщенности С-кольца. Их способность образовывать аддукт в малой бороздке и поперечно сшивать ДНК позволяет им препятствовать процессингу ДНК, а следовательно, обладать потенциалом использования в качестве антипролиферативных агентов.

[05] Первый поступивший на клинические исследования пирролобензодиазепин, SJG-136 (NSC 694501), является сильным цитотоксическим средством, вызывающим межнитевое поперечное сшивание ДНК (S.G Gregson *и др.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *и др.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *и др.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *и др.*, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould *и др.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509). По результатам I фазы клинической оценки SJG-136 обнаружилось, что данное средство было токсичным в чрезвычайно низких дозах (максимально переносимая доза 45 мкг/м²), и были отмечены несколько побочных эффектов, включая синдром пропотевания сосудов, периферический отек, гепатотоксичность и усталость. При всех дозах отмечались повреждения ДНК лимфоцитов, находящихся в системном кровообращении (D. Hochhauser *и др.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147). Таким образом, существует необходимость в улучшенных бензодиазепиновых производных, являющихся менее токсичными и при этом сохраняющих терапевтическую активность, для лечения различных состояний пролиферативной болезни, таких как рак.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

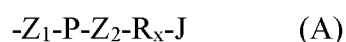
[06] Описанные здесь новые бензодиазепиновые соединения и их конъюгаты обладают удивительно высокой эффективностью против различных опухолевых клеток.

[07] Одной из задач изобретения является предоставление цитотоксического соединения, представленного любой из следующих формул:



или его фармацевтически приемлемой соли, где:

один из L', L'' и L''' описан следующей формулой:



а два других одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, галогена, гуанидиния $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', цианогруппы, азидной группы, -COR', -OCOR' и -OCONR'R'';

один из Z₁ и Z₂ является -C(=O)-, а другой является -NR₅-;

P является аминокислотным остатком или пептидом, содержащим от 2 до 20 аминокислотных остатков;

R_x является необязательно замещенным линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода;

J является фрагментом, содержащим функциональную группу, способную ковалентно связывать цитотоксическое соединение со связывающимся с клетками агентом;

двойная линия == между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь, при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y является -H либо же линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода, а если это одинарная связь, то X является -H или аминокислотным фрагментом;

Y является уходящей группой, выбранной из -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', необязательно замещенного 5- или 6-членного азотосодержащего гетероцикла (*напр.*, пиперидина, тетрагидропиррола, пиразола, морфолина и т.д., присоединенного через атом азота), гуанидина, представленного -NR'(C=NH)NR'R'', аминокислотного остатка или пептида, представленного -NRCOP', -SR, -SOR', галогена, цианогруппы, азидной группы, -OSO₃H, сульфита (-SO₃H или -SO₂H), метабисульфита (H₂S₂O₅), моно-, ди-, три- и тетра-тиофосфата (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂), тиофосфатного эфира (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, тиосульфата (HS₂O₃), дитионита (HS₂O₄), дитиофосфата (P(=S)(OR^k)(S)(OH)), гидроксамовой кислоты (R^kC(=O)NOH) и формальдегид-сульфоксилата (HOCH₂SO₂') или их комбинаций, где Rⁱ является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода и замещенным по меньшей мере одним заместителем, выбранным из -N(R^j)₂, -CO₂H, -SO₃H и -PO₃H; Rⁱ может быть дополнительно замещен заместителем для описанного здесь

алкила; R^j является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода; R^k является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероциклилом или гетероарилом;

P' является аминокислотным остатком или полипептидом, содержащим от 2 до 20 аминокислотных остатков,

R при каждом появлении независимо выбран из группы, состоящей из $-H$, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, необязательно замещенного арила, имеющего от 6 до 18 атомов углерода, необязательно замещенного 5-18-членного гетероарильного кольца, содержащего один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или необязательно замещенного 3-18-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-6 гетероатомов, независимо выбранных из O, S, N и P;

каждый из R' и R'' независимо выбран из $-H$, $-OH$, $-OR$, $-NHR$, $-NR_2$, $-COR$, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, или необязательно замещенного 3-18-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-6 гетероатомов, независимо выбранных из O, S, N и P;

R^c является $-H$ или необязательно замещенным линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода;

n является целым числом от 1 до 24;

X' выбран из $-H$, аминокислотной группы, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, необязательно замещенного арила, имеющего от 6 до 18 атомов углерода, необязательно замещенного 5-18-членного гетероарильного кольца, содержащего один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и необязательно замещенного 3-18-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-6 гетероатомов, независимо выбранных из O, S, N и P;

Y' выбран из $-H$, оксогруппы, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, необязательно замещенного 6-18-членного арила, необязательно замещенного 5-18-

членного гетероарильного кольца, содержащего один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или необязательно замещенного 3-18-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-6 гетероатомов;

каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' и R_4' независимо выбран из группы, состоящей из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, галогена, гуанидиния $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', цианогруппы, азидной группы, -COR', -OCOR' и -OCONR'R'';

R_6 является -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂ или галогеном;

G является -CH- или -N-;

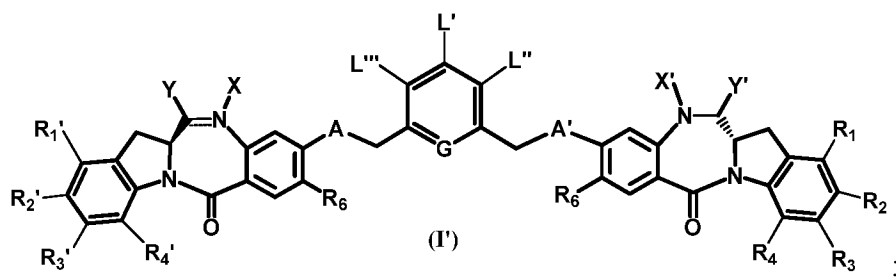
A и A' одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -O-, оксогруппы (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ и -CRR'N(R₅)-; и

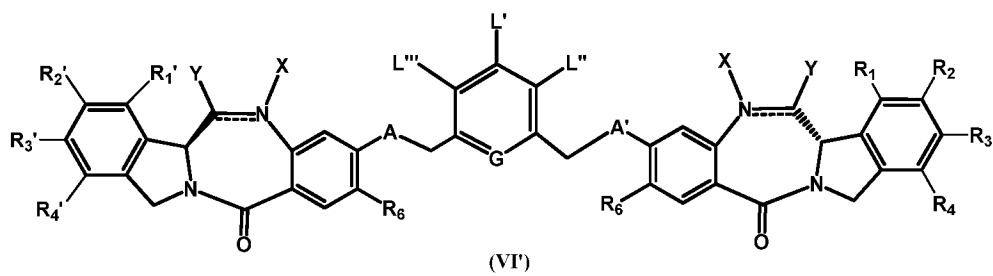
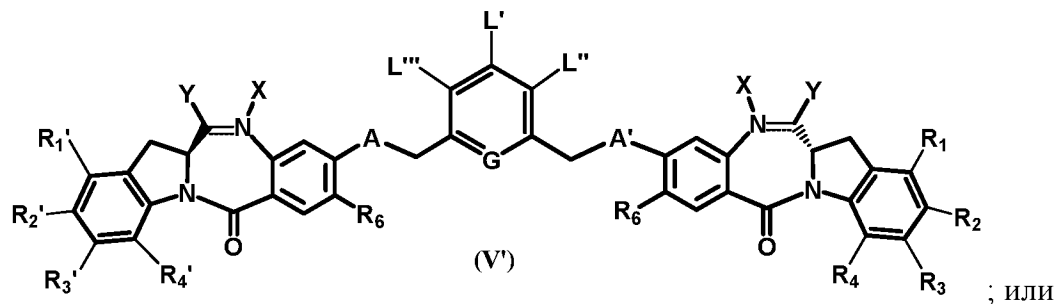
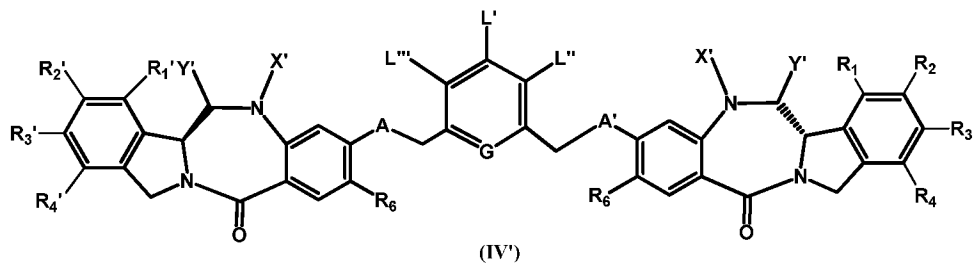
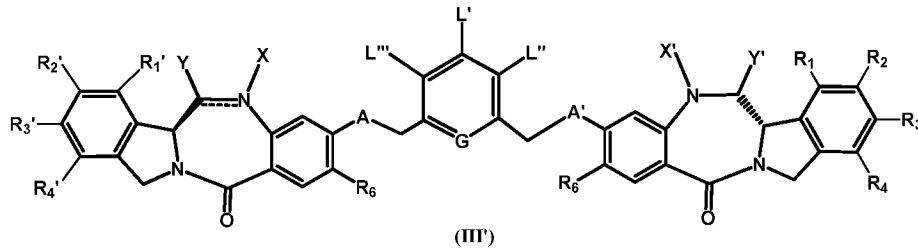
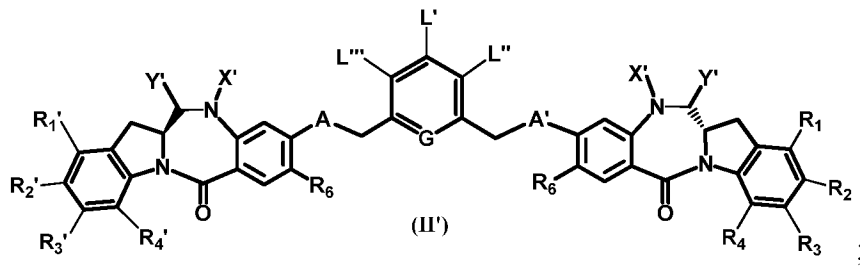
R_5 при каждом появлении независимо является -H или необязательно замещенным линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода.

[08] В одном варианте реализации для соединений структурных формул (I)-(VI) G является -CH-.

[09] Второй задачей изобретения является предоставление конъюгатов связывающихся с клетками агентов с новыми бензодиазепиновыми соединениями или их производными согласно настоящему изобретению. Эти конъюгаты пригодны в качестве терапевтических веществ, доставляемых точно к целевым клеткам, и являются цитотоксическими.

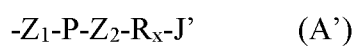
[10] Более конкретно конъюгат согласно изобретению может включать: цитотоксическое соединение и связывающийся с клетками агент (СКА), при этом цитотоксическое соединение ковалентно связано с СКА, и где указанное цитотоксическое соединение описано одной из следующих формул:





или его фармацевтически приемлемой соли, где:

один из L' , L'' и L''' описан следующей формулой:



а два других одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $(CH_2CH_2O)_n-R^c$,

галогена, гуанидиний $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NR'COR''$, $-SR$, сульфоксида, представленного $-SOR'$, сульфона, представленного $-SO_2R'$, сульфоната $-SO_3M$, сульфата $-OSO_3M$, сульфонамида, представленного $-SO_2NR'R''$, цианогруппы, азидной группы, $-COR'$, $-OCOR'$ и $-OCONR'R''$;

J' является фрагментом, содержащим соединительную группу, ковалентно связанную со связывающимся с клетками агентом; и

остальные переменные такие же, как описанные выше для формул (I)-(VI).

[11] В одном варианте реализации для конъюгатов структурных формул (I')-(VI') G является $-CH-$.

[12] В другом варианте реализации для конъюгатов структурных формул (I')-(VI') связывающийся с клетками агент является антителом против рецептора фолиевой кислоты или фрагментом такого антитела. Более конкретно антитело против рецептора фолиевой кислоты является антителом huMOV19.

[13] В еще одном варианте реализации для конъюгатов структурных формул (I')-(VI') связывающийся с клетками агент является антителом против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) или фрагментом такого антитела. В одном варианте осуществления антитело против EGFR является неантагонистическим антителом, включая, *напр.*, описанные в WO2012058592 антитела, включенные в настоящее описание посредством ссылки. В другом варианте реализации антитело против EGFR является нефункциональным антителом, *напр.*, гуманизированным ML66. Более конкретно антитело против EGFR является huML66.

[14] Настоящее изобретение также включает композицию (*напр.*, фармацевтическую композицию), содержащую новые бензодиазепиновые соединения, их производные или их конъюгаты (и/или сольваты, гидраты и/или соли) и носитель (фармацевтически приемлемый носитель). Настоящее изобретение дополнительно охватывает композицию (*напр.*, фармацевтическую композицию), содержащую новые бензодиазепиновые соединения, их производные или их конъюгаты (и/или сольваты, гидраты и/или соли) и носитель (фармацевтически приемлемый носитель), и дополнительно второй терапевтический агент. Настоящие композиции пригодны для ингибирования неестественного роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего (*напр.*, человека). Настоящие композиции пригодны для лечения состояний, таких как рак, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, реакция "трансплантат-против-хозяина" (РТПХ), отторжение трансплантата, волчанка, миозит,

инфекция, иммунодефицит, такой как СПИД, а также воспалительных заболеваний у млекопитающего (*напр.*, человека).

[15] Настоящее изобретение охватывает способ ингибирования неестественного роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего (*напр.*, человека), включающий введение упомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества новых бензодиазепиновых соединений, их производных или их конъюгатов (и/или их сольватов и солей) или их композиции, отдельно или в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[16] Настоящее изобретение охватывает способ синтеза и использования новых бензодиазепиновых соединений, их производных и их конъюгатов для диагностики или лечения клеток, организмов или ассоциированных патологических состояний у млекопитающих *in vitro*, *in situ* и *in vivo*.

[17] Соединения согласно изобретению, их производные или их конъюгаты, а также содержащие их композиции пригодны для лечения или облегчения тяжести расстройств, таких как характеризующиеся аномальным ростом клеток (*напр.*, рак). Другие применения соединений и конъюгатов согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, лечение состояний, таких как рак, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, реакция "трансплантат-против-хозяина" (РТПХ), отторжение трансплантата, волчанка, миозит, инфекция, иммунодефицит, такой как СПИД, а также воспалительных заболеваний у млекопитающего (*напр.*, человека).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[18] На ФИГ. 1 показана аффинность связывания конъюгата **huMOV19-14** с клетками T47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

[19] На ФИГ. 2 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата **huMOV19-14** *in vitro*.

[20] На ФИГ. 3 показано, что конъюгат **huMOV19-14** оказывает слабый цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

[21] На ФИГ. 4А, 4В и 4С показана цитотоксичность конъюгата **huMy9-6-14** *in vitro* против различных клеточных линий.

[22] На ФИГ. 5А и 5В показано, что конъюгат **huMy9-6-14** оказывает цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

[23] На ФИГ. 6 показана эффективность конъюгатов **huMOV19-80** и **huMOV19-90** *in*

vivo у несущих NCI-H2110 мышей с ТКИД.

[24] На ФИГ. 7А-7D показаны масс-спектрометрические профили образцов конъюгатов согласно настоящему изобретению.

[25] На ФИГ. 8 показан масс-спектрометрический профиль конъюгата **huML66-90**.

[26] На ФИГ. 9 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата **huML66-90** *in vitro*.

[27] На ФИГ. 10, 11 и 12 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата **huMOV19-90** *in vitro*.

[28] На ФИГ. 13 показано, что конъюгат huMOV19-90 оказывает сильный цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

[29] На ФИГ. 14 показана эффективность конъюгата **huMOV19-90** *in vivo* у несущих NCI-H2110 мышей с ТКИД.

[30] На ФИГ. 15А и 15В показана аффинность связывания конъюгата **huMOV19-90** с клетками Т47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

[31] На ФИГ. 16 показаны масс-спектрометрические профили образцов конъюгатов согласно настоящему изобретению.

[32] На ФИГ. 17 показана эффективность конъюгата **huML66-90** *in vivo* у несущих NCI-H1703 NSCLC мышей с ТКИД.

[33] На ФИГ. 18 показана фармакокинетика **huMOV19-90** в мышах CD-1.

[34] На ФИГ. 19А и 19В показана структура конъюгата **huMOV19-90** (ФИГ. 19А), а также схема инкубирования, очистки и выделения катаболитов из **huMOV19-90**-конъюгата, образованного в клетках рака шейки матки KB *in vitro* (ФИГ. 19В). Три катаболита, идентифицированные с помощью ЖХ-МС, показаны с рассчитанной массой.

[35] На ФИГ. 20 показана аффинность связывания конъюгата **huMOV19-107** с клетками Т47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

[36] На ФИГ. 21 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгатов **huMOV19-90** и **huMOV19-107** *in vitro*.

[37] На ФИГ. 22 показана эффективность конъюгата **huMOV19-90** *in vivo* у несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110 NSCLC мышей с ТКИД.

[38] На ФИГ. 23 показана эффективность конъюгата **huMOV19-90** *in vivo* у несущих

эндометриальные ксенотрансплантаты Нес-1b мышей с ТКИД.

[39] На ФИГ. 24 показана эффективность конъюгата **huMOV19-90** *in vivo* у несущих эндометриальные ксенотрансплантаты Ishikawa мышей с ТКИД.

[40] На ФИГ. 25 показана эффективность конъюгата **huMOV19-107** *in vivo* у несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110 NSCLC мышей с ТКИД.

[41] На ФИГ. 26 показана аффинность связывания конъюгата **huCD123-6Gv4,7S3-90** с клетками HNT-34 по сравнению с неконъюгированным антителом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[42] Здесь будет приведено подробное описание некоторых вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в приложенных структурах и формулах. В то время как изобретение будет описано в сочетании с перечисленными вариантами реализации, следует понимать, что они не предназначены для ограничения настоящего изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения, как определено его формулой. Специалистам в этой области техники будут очевидны многочисленные методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, которые могут быть использованы в практике настоящего изобретения.

[43] Следует понимать, что любой из описанных здесь вариантов реализации, включая описанные для разных аспектов изобретения (*напр.*, соединения, молекулы соединения-линкер, конъюгаты, композиции, способы получения и применения) и в разных частях описания (включая варианты, описанные только в Примерах), может быть скомбинирован с одним или более другими вариантами осуществления изобретения, если только это явно не отрицается или не неуместно. Комбинации вариантов реализации не ограничены конкретными комбинациями, заявленными во множественных зависимых пунктах формулы.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[44] Здесь и далее термин "**связывающийся с клетками агент**" или "**СКА**" обозначает соединение, способное связываться с клеткой (*напр.*, с лигандом, находящимся на поверхности клетки) или с лигандом, ассоциированным с клеткой или находящимся близко к ней, предпочтительно специфичным образом. В определенных вариантах

осуществления связывание с клеткой или лигандом, находящимся на клетке или близко к ней, является специфическим. СКА могут включать пептиды и непептидные вещества.

[45] "**Линейный** или **разветвленный** алкил" здесь и далее обозначает насыщенный одновалентный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющий от одного до двадцати атомов углерода. Примеры алкилов включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, 1-бутил, 2-метил-1-пропил, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-бутил, 2-метил-2-пропил, 1-пентил, 2-пентил 3-пентил, 2-метил-2-бутил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил), 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил, 3,3-диметил-2-бутил, 1-гептил, 1-октил и т.п. Предпочтительно алкил имеет от одного до десяти атомов углерода. Более предпочтительно алкил имеет от одного до четырех атомов углерода.

[46] "**Линейный** или **разветвленный** алкенил" здесь и далее обозначает одновалентный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющий от одного до двадцати атомов углерода и по меньшей мере одно ненасыщенное положение, *т.е.* углерод-углеродную двойную связь, при этом понятие алкенильного радикала охватывает радикалы "цис"- и "транс"-ориентации, или альтернативно "E"- и "Z"-ориентации. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этиленил или винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), и т.п. Предпочтительно алкенил имеет от двух до десяти атомов углерода. Более предпочтительно алкенил имеет от двух до четырех атомов углерода.

[47] "**Линейный** или **разветвленный** алкинил" обозначает одновалентный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющий от одного до двадцати атомов углерода и по меньшей мере одно ненасыщенное положение, *т.е.* углерод-углеродную тройную связь. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этинил, пропирил, 1-бутирил, 2-бутирил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-пентинил, гексинил и т.п. Предпочтительно алкинил имеет от двух до десяти атомов углерода. Более предпочтительно алкинил имеет от двух до четырех атомов углерода.

[48] Термины "**карбоцикл**", "**карбоциклил**" и "**карбоциклическое кольцо**" обозначают одновалентное неароматическое насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, имеющее от 3 до 12 атомов углерода как моноциклическое кольцо или от 7 до 12 атомов углерода как бициклическое кольцо. Бициклические карбоциклы, имеющие от 7 до 12 атомов, могут быть скомпонованы, к примеру, как бицикло-[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система, и бициклические карбоциклы, имеющие от 9 до 10 атомов, могут быть

скомпонованы как бицикло-[5,6] или [6,6] система, или как мостиковые системы, такие как бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан и бицикло[3.2.2]нонан. Примеры моноциклических карбоциклов включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-энил, 1-циклопент-2-энил, 1-циклопент-3-энил, циклогексил, 1-циклогекс-1-энил, 1-циклогекс-2-энил, 1-циклогекс-3-энил, циклогексадиенил, циклогептил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и т.п.

[49] Термины "**циклический алкил**" и "**циклоалкил**" могут использоваться взаимозаменяемо. Они обозначают одновалентный насыщенный карбоциклический кольцевой радикал. Предпочтительно циклический алкил является 3-7-членным моноциклическим кольцевым радикалом. Более предпочтительно циклический алкил является циклогексилем.

[50] Термин "**циклический алкенил**" обозначает карбоциклический кольцевой радикал, имеющий в структуре кольца хотя бы одну двойную связь.

[51] Термин "**циклический алкинил**" обозначает карбоциклический кольцевой радикал, имеющий в структуре кольца хотя бы одну тройную связь.

[52] "**Арил**" означает одновалентный ароматический углеводородный радикал, имеющий 6-18 атомов углерода, полученный устранением одного атома водорода от отдельного атома углерода начальной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в иллюстративных структурах как "Ar." Арилы включают бициклические радикалы, включающие ароматическое кольцо, сконденсированное с насыщенным кольцом, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются ими, радикалы-остатки бензола (фенил), замещенных бензолов, нафталина, антрацена, 1,2-дигидронафталина, инденил, инданил, 1,2,3,4-тетрагидронафтил и т.п. Предпочтительно арил является фенильной группой.

[53] Термины "**гетероцикл**", "**гетероциклил**" и "**гетероциклическое кольцо**" здесь и далее используются взаимозаменяемо и обозначают насыщенный или частично ненасыщенный (*m.e.*, имеющий одну или более двойные и/или тройные связи в кольце) карбоциклический радикал с от 3 до 18 атомов, в котором хотя бы один атом кольца является гетероатомом, выбранным из азота, кислорода, фосфора и серы, остальные атомы кольца являются углеродными, и где один или более атомов кольца необязательно замещены независимо одним или более заместителями, описанными ниже. Гетероцикл

может быть моноциклом, имеющим от 3 до 7 кольцевых членов (2-6 атомов углерода и 1-4 гетероатома, выбранных из N, O, P и S) или бициклом, имеющим от 7 до 10 кольцевых членов (4-9 атомов углерода и 1-6 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло-[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), в особенности разделы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности тома 13, 14, 16, 19 и 28; а также J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. Понятие "гетероцикл" также охватывает радикалы, в которых гетероциклические радикалы сконденсированы с насыщенным, частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваются ими, пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидропиридинил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил и азабицикло[2.2.2]гексанил. Спирогруппы также входят в объем данного определения. Примерами гетероциклической группы, в которой атомы кольца замещены оксо (=O) группами, являются пиримидинонил и 1,1-диоксо-тиоморфолинил.

[54] Термин "гетероарил" обозначает одновалентный ароматический радикал 5- или 6-членных колец и охватывает сконденсированные кольцевые системы (хотя бы одна из которых является ароматической) из 5-18 атомов, содержащие один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Примерами гетероарильных групп являются пиридинил (в том числе, *напр.*, 2-гидроксипиридинил), имидазолил, имидазопиридинил, пиримидинил (в том числе, *напр.*, 4-гидроксипиримидинил), пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, тиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуринил, оксадиазолил, триазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил.

[55] Гетероциклические или гетероарильные группы могут быть присоединены через углерод (углерод-связанные) или через азот (азот-связанные). В качестве примера, но не ограничения, углерод-связанные гетероциклы или гетероарилы присоединены в положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиофурана, тиофена, пиррола или тетрагидропиррола, положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, положении 2 или 3 азиридина, положении 2, 3 или 4 азетидина, положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина.

[56] В качестве примера, но не ограничения, азот-связанные гетероциклы или гетероарилы присоединены в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола, положении 2 изоиндола или изоиндолина, положении 4 морфолина и положении 9 карбазола или О-карболина.

[57] Гетероатомы в гетероариле или гетероциклиле включают окисленные формы, такие как NO, SO и SO₂.

[58] Термин "гало" или "галоген" обозначает F, Cl, Br или I.

[59] Вышеописанные алкил, алкенил, алкинил, циклический алкил, циклический алкенил, циклический алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил могут быть необязательно замещены одним или более (*напр.*, 2, 3, 4, 5, 6 или более) заместителями.

[60] Если заместитель описан как "замещенный", то на месте водородного заместителя при углероде, кислороде, сере или азоте заместителя находится неводородный заместитель. Так, *напр.*, замещенный алкильный заместитель является алкильным заместителем, в котором на месте водородного заместителя находится по меньшей мере один неводородный заместитель. Для иллюстрации, монофторалкил является алкилом, замещенным фторным заместителем, а дифторалкил является алкилом, замещенным двумя фторными заместителями. Следует понимать, что если в заместителе имеется больше чем одно замещение, то каждый неводородный заместитель может быть одинаковым или отличаться (если не указано иное).

[61] Если заместитель описан как "необязательно замещенный", то заместитель может быть либо (1) не замещенным, либо (2) замещенным. Если углеродный атом заместителя описан как необязательно замещенный одним или более из перечня заместителей, то один

или более водородных атомов при этом углеродном (в тех случаях, когда при нем есть таковые) могут по отдельности и/или вместе быть заменены независимо выбранным необязательным заместителем. Если азотный атом заместителя описан как необязательно замещенный одним или более из перечня заместителей, то один или более водородных атомов при этом азотном (в тех случаях, когда при нем есть таковые) могут быть заменены независимо выбранным необязательным заместителем. Один пример заместителя может быть описан как $-NR'R''$, где R' и R'' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать гетероциклическое кольцо. Гетероциклическое кольцо, образованное R' и R'' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, может быть частично или полностью насыщенным. В одном варианте осуществления гетероциклическое кольцо состоит из 3-7 атомов. В другом варианте осуществления гетероциклическое кольцо выбрано из группы, включающей пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, изоксазолил, пиридил и тиазолил.

[62] В настоящем описании термины "заместитель", "радикал" и "группа" использованы взаимозаменяемо.

[63] Если группа заместителей в совокупности описана как необязательно замещенные одним или более из перечня заместителей, то группа может включать в себя: (1) незамещаемые заместители, (2) замещаемые заместители, которые не замещены необязательными заместителями, и/или (3) замещаемые заместители, которые замещены одним или более необязательными заместителями.

[64] Если заместитель описан как необязательно замещенный неводородными заместителями вплоть до определенного их количества, то этот заместитель может быть либо (1) не замещен; либо (2) замещен неводородными заместителями вплоть до этого определенного их количества, или вплоть до максимального числа замещаемых положений заместителя, в зависимости от того, что меньше. Так, *напр.*, если заместитель описан как гетероарил, необязательно замещенный неводородными заместителями в количестве до 3-х, то любой гетероарил с менее чем 3-мя замещаемыми положениями будет необязательно замещен не более чем таким количеством неводородных заместителей, сколько у этого гетероарила имеется замещаемых положений. Такие заместители, для неограничивающего примера, могут быть выбраны из линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, арила, гетероарила, гетероциклила, галогена, гуанидиния $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, сульфоксида, представленного $-SOR^{101}$, сульфона, представленного $-SO_2R^{101}$, сульфоната $-SO_3M$,

сульфата $-\text{OSO}_3\text{M}$, сульфонида, представленного $-\text{SO}_2\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$, цианогруппы, азидной группы, $-\text{COR}^{101}$, $-\text{OCOR}^{101}$, $-\text{CONR}^{101}\text{R}^{102}$ и полиэтиленгликолевого звена $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{R}^{101}$, где M является H или катионом (таким как Na^+ или K^+); R^{101} , R^{102} и R^{103} каждый независимо выбран из H, линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{R}^{104}$, где n является целым числом от 1 до 24, арила, имеющего от 6 до 10 атомов углерода, гетероциклического кольца, имеющего от 3 до 10 атомов углерода, и гетероарила, имеющего от 5 до 10 атомов углерода; и R^{104} является H или линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода, при этом алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил и гетероциклил в группах, представленных R^{100} , R^{101} , R^{102} , R^{103} и R^{104} , необязательно замещены одним или более (*напр.*, 2, 3, 4, 5, 6 или более) заместителями, независимо выбранными из галогена, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ и незамещенного линейного или разветвленного алкила, имеющего от 1 до 4 атомов углерода. Предпочтительно заместители для вышеописанных необязательно замещенных алкила, алкенила, алкинила, циклического алкила, циклического алкенила, циклического алкинила, карбоциклила, арила, гетероциклила и гетероарила включают галоген, $-\text{CN}$, $-\text{NR}^{102}\text{R}^{103}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OR}^{101}$, арил, гетероарил, гетероциклил, $-\text{SR}^{101}$, $-\text{SOR}^{101}$, $-\text{SO}_2\text{R}^{101}$ и $-\text{SO}_3\text{M}$.

[65] Термины "соединение" или "цитотоксическое соединение", "цитотоксический димер" и "цитотоксическое димерное соединение" используются взаимозаменяемо. Подразумевается, что они охватывают соединения, для которых структура или формула или любое их производное были описаны в настоящем изобретении, либо структуры или формулы или любые производные, включенные посредством ссылки. Термин также охватывает стереоизомеры, геометрические изомеры, таутомеры, сольваты, метаболиты, соли (*напр.*, фармацевтически приемлемые соли) и пролекарства, а также соли, являющиеся пролекарствами, соединения по всем формулам, приведенным в настоящем изобретении. Термин также включает любые сольваты, гидраты и полиморфы любого из вышеупомянутых веществ. Конкретное перечисление "стереоизомеров", "геометрических изомеров", "таутомеров", "сольватов", "метаболитов", "солей", "пролекарств", "солей-пролекарств", "конъюгатов" "солей конъюгатов", "сольвата", "гидрата" или "полиморфа" в некоторых аспектах изобретения, описанного в данной заявке, не должно быть истолковано как преднамеренное упущение этих форм в других аспектах изобретения, в которых термин "соединение" используется без перечисления этих других форм.

[66] Термин "конъюгат" здесь и далее обозначает описанное здесь соединение или его производное, присоединенное к связывающемуся с клетками агенту.

[67] Термин "**присоединяемый к связывающемуся с клетками агенту**" здесь и далее обозначает описанные здесь соединения или их производные, содержащие хотя бы одну соединительную группу или ее предшественник, подходящую для присоединения этих соединений или их производных к связывающемуся с клетками агенту.

[68] Термин "**предшественник**" некоей группы обозначает любую группу, из которой можно получить эту некую группу путем любого удаления защитной группы, химической модификации или реакции сочетания.

[69] Термин "**присоединенный к связывающемуся с клетками агенту**" обозначает молекулу-конъюгат, содержащую по меньшей мере одно из описанных здесь соединений (*напр.*, соединения формул (I)-(IV) и (VIII)-(XI), а также описанные здесь соединения лекарство-линкер) или его производное, соединенное со связывающимся с клетками агентом через подходящую соединительную группу или ее предшественник.

[70] Термин "**хиральный**" обозначает молекулы, обладающие свойством несовпадения при наложении со своим зеркальным отражением, в то время как термин "ахиральный" обозначает молекулы, совпадающие при наложении со своим зеркальным отражением.

[71] Термин "**стереоизомер**" обозначает соединения, имеющие одинаковый химический состав и связность, но разные ориентации атомов в пространстве, которые не могут взаимопреобразовываться путем вращения вокруг отдельных связей.

[72] "**Диастереомер**" обозначает стереоизомер с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальными отражениями друг друга. Диастереомеры имеют разные физические свойства, *напр.*, точки плавления, кипения, спектральные свойства и реакционные способности. Смеси диастереомеров можно разделить высокочувствительными аналитическими методами, такими как кристаллизация, электрофорез и хроматография.

[73] "**Энантиомеры**" обозначают два стереоизомера соединения, являющиеся несовместимыми при наложении зеркальными отражениями друг друга.

[74] Стереохимические определения и правила, использованные здесь, в целом придерживаются S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения согласно изобретению могут содержать асимметрические или хиральные центры и, таким образом, существовать в разных стереоизомерных формах. Подразумевается, что все стереоизомерные формы соединений согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры,

энантимеры и атропоизомеры, равно как и их смеси, такие как рацематы, образуют часть настоящего изобретения. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, *т.е.* обладают способностью вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения используют префиксы D и L, или R и S, для обозначения абсолютной конфигурации молекулы по отношению к ее хиральному центру (-ам). Префиксы d и l или (+) и (-) используют для обозначения знака вращения плоскополяризованного света соединением, при этом (-) или l означает, что соединение левовращающее. Соединение с префиксом (+) или d - правовращающее. Для заданной химической структуры эти стереоизомеры идентичны за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Конкретный стереоизомер может также быть обозначен как энантиомер, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, и может быть получена при отсутствии стереоселективности или стереоспецифичности химической реакции или процесса. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" обозначают эквимольную смесь двух энантиомерных видов, не обладающую оптической активностью.

[75] Термин "**таутомер**" или "**таутомерная форма**" обозначает структурные изомеры с разными энергиями, которые могут взаимопреобразовываться через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения через миграцию протона, такие как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризации. Валентные таутомеры включают взаимопревращения через перегруппировку некоторых электронов связи.

[76] Термин "**пролекарство**" в контексте данной заявки обозначает форму-предшественник или производное соединения согласно изобретению, которая способна ферментативно или гидролитически активироваться или превращаться в более активную родительскую форму. См., *напр.*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Пролекарства согласно данному изобретению включают, но не ограничиваются ими, содержащие сложные эфиры пролекарства, фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, модифицированные D-аминокислотами пролекарства, гликозилированные пролекарства, β -лактам-содержащие пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид

пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид пролекарства, 5-фторцитозинового и другие 5-фторуридинового пролекарства, которые могут быть преобразованы в более активное свободное цитотоксическое лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, из которых могут быть получены пролекарства для применения в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, соединения согласно настоящему изобретению и химиотерапевтические агенты, такие как вышеописанные.

[77] Термин "**пролекарство**" также подразумевает производное соединения, способное гидролизаться, окисляться или каким-либо другим образом реагировать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) для обеспечения соединения согласно настоящему изобретению. Пролекарства могут становиться активными только после такой реакции в биологических условиях или же могут обладать активностью в непрореагировавшем виде. Примеры пролекарств, предусмотренных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, аналоги или производные соединений любой из описанных здесь формул, которые включают биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарств включают производные соединений любой из описанных здесь формул, включающие фрагменты -NO, -NO₂, -ONO или -ONO₂. Пролекарства обычно могут быть изготовлены с использованием хорошо известных методов, таких как описанные в Burger's Medicinal Chemistry и Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); см. также Goodman и Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

[78] Одна предпочтительная форма пролекарства согласно изобретению включает соединения (с или без линкерных групп) и конъюгаты согласно изобретению, содержащие аддукт, образованный между иминной связью соединений/конъюгатов и иминореагирующим реагентом. Другая предпочтительная форма пролекарства согласно изобретению включает соединения, такие как в формулах (I) - (IV), в которых если двойная линия == между N и C представляет одинарную связь, то X является H или аминоксигнальной группой, и соединение становится пролекарством. Пролекарство согласно изобретению может включать одну или обе формы пролекарств, описанных здесь (*напр.*, содержащую аддукт, образованный между иминной связью соединений/конъюгатов и иминореагирующим реагентом, и/или содержащую уходящую группу Y, когда X является

-H).

[79] Термин **"иминореагирующий реагент"** относится к реагенту, способному реагировать с иминной группой. Примеры иминореагирующих реагентов включают, но не ограничиваются ими, сульфиты (H_2SO_3 , H_2SO_2 или соль HSO_3^- , SO_3^{2-} или HSO_2^- образованная с катионом), метабисульфит ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ или соль $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ образованная с катионом), моно-, ди-, три- и тетра-тиофосфаты (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 или соль PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} или PS_4^{3-} образованная с катионом), тиофосфатные сложные эфиры ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), различные амины (гидроксиламин (*напр.*, NH_2OH), гидразин (*напр.*, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^{i'}\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$, тиосульфат ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ или соль $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ образованная с катионом), дитионит ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ или соль $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ образованная с катионом), дитиофосфат ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ или его соль, образованная с катионом), гидроксамовую кислоту ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ или соль, образованная с катионом), гидразид ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), формальдегид-сульфоксилат ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ или соль $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ образованная с катионом, таким как $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), гликозилированный нуклеотид (такой как ГДФ-манноза), флударабин или их смесь, где R^i и $\text{R}^{i'}$ каждый независимо являются линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, и замещены по меньшей мере одним заместителем, выбранным из $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i и $\text{R}^{i'}$ могут быть дополнительно замещены заместителем для описанного здесь алкила; R^j является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода; и R^k является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероциклилом или гетероарилом (предпочтительно R^k является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода; более предпочтительно R^k является метилом, этилом или пропилом). Предпочтительно катион является одновалентным катионом, таким как Na^+ или K^+ . Предпочтительно иминореагирующий реагент выбран из сульфитов, гидроксиламина, мочевины и гидразина. Более предпочтительно иминореагирующий реагент является NaHSO_3 или KHSO_3 .

[80] Здесь и далее, если не указано иное, термины **"биогидролizuемый амид"**, **"биогидролizuемый сложный эфир"**, **"биогидролizuемый карбамат"**, **"биогидролizuемый карбонат"**, **"биогидролizuемый уреид"** и **"биогидролizuемый фосфатный аналог"** означают амид, сложный эфир, карбамат, карбонат, уреид или фосфатный аналог, соответственно, которые либо: 1) не лишают соединения биологической активности и предоставляют ему полезные свойства *in vivo*, такие как

усвоение, длительность действия или начало действия; или 2) сами по себе биологически неактивны, но *in vivo* преобразуются в биологически активное соединение. Примеры биогидролизуемых амидов включают, но не ограничиваются ими, низшие алкиламиды, амиды α -аминокислот, алкоксиациламиды и алкиламиноалкилкарбониламиды. Примеры биогидролизуемых сложных эфиров включают, но не ограничиваются ими, низшие алкилэфиры, алкоксиацетоксиэфиры, алкилациламиноалкилэфиры и холиновые эфиры. Примеры биогидролизуемых карбаматов включают, но не ограничиваются ими, низшие алкиламины, замещенные этилендиамины, аминокислоты, гидроксиалкиламины, гетероциклические и гетероароматические амины и полиэфирные амины. Особенно предпочтительными пролекарствами и солями пролекарств являются те, которые увеличивают биодоступность соединений согласно изобретению при введении таких соединений млекопитающим.

[81] Фраза "**фармацевтически приемлемая соль**" здесь и далее обозначает фармацевтически приемлемые органические или неорганические соли соединения согласно изобретению. Примеры солей включают, но не ограничиваются ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат "мезилат," этансульфонат, бензолсульфонат, *p*-толуолсульфонат, памоат (*m.e.* 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)) соли щелочных металлов (*напр.*, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (*напр.*, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может охватывать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более чем один заряженный атом. В случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, она может иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или более противоион.

[82] Если соединение по изобретению представляет собой основание, то желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим способом, доступным в данной области, *напр.*, обработка свободного основания неорганической кислотой, такой как соляная кислота, бромоводородная кислота, серная кислота, азотная

кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и и т.п., или органической кислотой, такой как уксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидиловые кислоты, такие как глюкуроновая кислота или галактуроновая кислота, альфа-гидроксикислоты, такие как лимонная кислота или винная кислота, аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматические кислоты, такие как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфонокислоты или этансульфоновая кислота, или им подобные.

[83] Если соединение согласно изобретению представляет собой кислоту, то желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим способом, *напр.*, обработка свободной кислоты неорганическим или органическим основанием, таким как амин (первичный, вторичный или третичный), гидроксид щелочного металла или гидроксид щелочноземельного металла, или им подобные. Иллюстративные примеры подходящих солей включают в себя, но не ограничиваются ими, органические соли, полученные с использованием аминокислот, таких как глицин и аргинин, аммиака, первичных, вторичных и третичных аминов, а также циклических аминов, таких как пиперидин, морфолин и пиперазин, и неорганические соли, полученные с использованием натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

[84] Здесь и далее термин "**сольват**" означает соединение, дополнительно включающее стехиометрическое или нестехиометрическое количество растворителя, такого как вода, изопропанол, ацетон, этанол, метанол, ДМСО, этилацетат, уксусная кислота, этаноламин дихлорметан, 2-пропанол или им подобных, связанное нековалентными межмолекулярными силами. Сольваты или гидраты соединений легко получить добавлением к соединению по меньшей мере одного молярного эквивалента гидроксильного растворителя, такого как метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол или вода, чтобы привести к сольватации или гидратации иминного фрагмента.

[85] Термины "**аномальный рост клеток**" и "**пролиферативное расстройство**" в настоящей заявке используются взаимозаменяемо. "**Аномальный рост клеток**" здесь и далее, если не указано иное, обозначает рост клеток, не зависящий от нормальных регуляторных механизмов (*т.е.*, потерю контактного торможения). Это включает, к примеру, аномальный рост: (1) опухолевых клеток (опухолей), которые пролиферируют путем экспрессии мутантной тирозинкиназы или сверхэкспрессии рецепторной тирозинкиназы; (2) доброкачественных и злокачественных клеток других

пролиферативных заболеваний, при которых происходит активация аберрантной тирозинкиназы; (3) любых опухолей, которые пролиферируют посредством рецепторных тирозинкиназ; (4) любых опухолей, которые пролиферируют путем нарушенной активации серин/треонинкиназы; и (5) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний, при которых происходит нарушенная активация серин/треонинкиназы.

[86] Термины "**рак**" и "**раковый**" обозначают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. "**Опухоль**" включает одну или несколько раковых клеток, и/или доброкачественных или предраковых клеток.

[87] "**Терапевтическое вещество**" охватывает как биологический агент, такой как антитело, пептид, белок, фермент, так и химиотерапевтическое вещество.

[88] "**Химиотерапевтическое вещество**" является химическим соединением, полезным при лечении рака.

[89] "**Метаболит**" является продуктом, полученным при метаболизме в организме конкретного соединения, его производного, его конъюгата или его соли. Метаболиты соединения, его производного или его конъюгата могут быть определены с помощью обычных методов, известных в данной области техники, а их активность - определена с помощью тестов, таких как описанные в настоящем документе. Такие продукты могут произойти, *напр.*, от окисления, гидроксирования, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления и т.п. вводимого соединения. Соответственно, настоящее изобретение включает метаболиты соединений, их производных или конъюгатов согласно изобретению, включая соединения, их производные или их конъюгаты, полученные способом, включающим контакт соединения, его производного или конъюгата согласно настоящему изобретению с млекопитающим в течение периода времени, достаточного с получением его метаболического продукта.

[90] Фраза "**фармацевтически приемлемый**" означает, что вещество или композиция должны быть совместимы химически и/или токсикологически с другими ингредиентами состава и/или с млекопитающим, подлежащим лечению ими.

[91] Термин "**защитная группа**" или "**защитный фрагмент**" относится к заместителю, который обычно используют для блокирования или защиты конкретной функциональности в процессе реагирования других функциональных групп соединения,

его производного или его конъюгата. Например, **"аминозащитная группа"** или **"аминозащитный фрагмент"** является заместителем, присоединенным к аминогруппе, который блокирует или защищает аминную функциональность в соединении. Такие группы хорошо известны в данной области (см., напр., P. Wuts и T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ), их примерами являются карбаматы, такие как метил- и этилкарбаматы, ФМОК, замещенные этилкарбаматы, отщепляемые 1,6-β-элиминированием карбаматы (также именуется **"саморасщепляющимися"**), мочевины, амиды, пептиды, производные алкилов и арилов. Подходящие аминозащитные группы включают ацетил, трифторацетил, т-бутоксикарбонил (БОК), бензилоксикарбонил (КБЗ) и 9-фторенилметиленоксикарбонил (ФМОК). Для общего описания защитных групп и их использования см. P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007.

[92] Термин **"уходящая группа"** обозначает группу заряженного или незаряженного фрагмента, отходящую во время замещения или вытеснения. Такие уходящие группы хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, галогены, сложные эфиры, алкоксигруппы, гидроксильные группы, тозилаты, трифлаты, мезилаты, нитрилы, азидные группы, карбаматы, дисульфиды, сложные тиоэфиры, простые тиоэфиры и соединения диазония.

[93] Термин **"бифункциональный сшивающий агент"**, **"бифункциональный линкер"** или **"сшивающие агенты"** обозначает модифицирующие вещества, обладающие двумя реакционноспособными группами; одна из них способна реагировать со связывающимся с клетками агентом, в то время как другая реагирует с цитотоксическим соединением для связывания двух фрагментов воедино. Подобные бифункциональные сшиватели хорошо известны в данной области (см., напр., Isalm и Dent в *Bioconjugation* глава 5, стр. 218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Например, бифункциональные сшивающие агенты, которые обеспечивают соединение через тиоэфирную связь, включают *N*-сукцинимидил-4-(*N*-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК) для введения малеимидных групп, или *N*-сукцинимидил-4-(иодацетил)-аминобензоат (СИАБ) для введения иодацетильных групп. Другие бифункциональные сшивающие агенты, которые вводят в связывающийся с клетками агент малеимидные группы или галоацетильные группы, хорошо известны в данной области (см. патентные заявки США 2008/0050310, 20050169933, доступны от Pierce Biotechnology Inc. PO Box 117, Rockland, IL 61105, США) и включают, но не ограничиваются ими, бис-малеимидополиэтиленгликоль (БМПЭО), БМ(ПЭО)₂,

БМ(ПЭО)₃, N (β-малеимидопропилокси) сукцинимидный сложный эфир (BMPS), γ-малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый сложный эфир (GMBS), ε-малеимидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (EMCS), 5-малеимидовалериановой кислоты N-ГСЭ, HBVS, N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS), 4-(4-N-малеимидофенил)гидразид или гидрохлорид масляной кислоты (MPBH), N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), N-сукцинимидил йодоацетат (SIA), κ-малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый сложный эфир (KMUA), N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)-бутират (SMPB), сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), сукцинимидил-(4-винилсульфонил)бензоат (SVSB), дитиобис-малеимидоэтан (DTME), 1,4-бис-малеимидобутан (BMB), 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDVB), бис-малеимидогексан (BMH), бис-малеимидоэтан (BMOE), сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), сульфосукцинимидил(4-иод-ацетил) аминобензоат (сульфо-SIAB), м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-MBS), N-(γ-малеимидобутрилокси) сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-GMBS), N (ε-малеимидокапроилокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-EMCS), N-(κ-малеимидоундеканоилокси) сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-KMUS) и сульфосукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-SMPB).

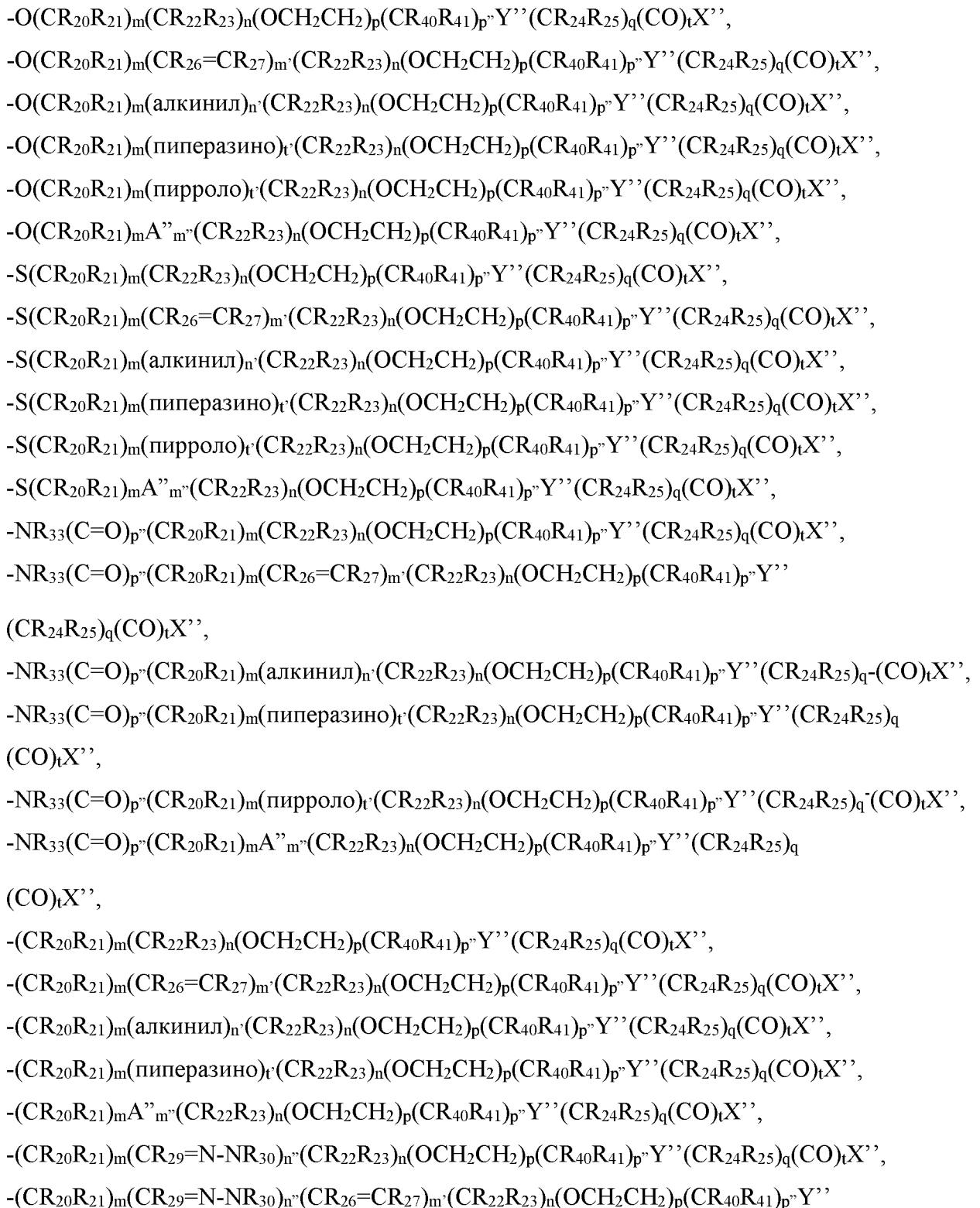
[94] Гетеробифункциональные сшивающие агенты являются бифункциональными сшивающими агентами, имеющими две разные реакционноспособные группы. Гетеробифункциональные сшивающие агенты, содержащие как аминореактивную N-гидроксисукцинимидную группу (группа NHS) и карбонильнореактивную гидразиновую группу, также могут быть использованы для соединения цитотоксических соединений, описанных в настоящей заявке, со связывающимся с клетками агентом (*напр.*, антителом). Примеры доступных в продаже таких гетеробифункциональных сшивающих агентов включают сукцинимидил 6-гидразиноникотинамид ацетон гидразон (SANH), сукцинимидил 4-гидразидотерефталат гидрохлорид (SHTH) и сукцинимидил гидразиния никотинат гидрохлорид (SHNH). Конъюгаты с кислотнo-лабильным соединением также могут быть сделаны с использованием гидразинсодержащего бензодиазепинового производного согласно настоящему изобретению. Примеры бифункциональных сшивающих агентов, которые могут использоваться, включают сукцинимидил-п-формилбензоат (SFB) и сукцинимидил-п-формилфеноксиацетат (SFPA).

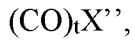
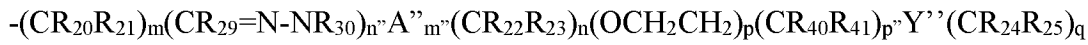
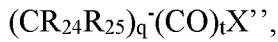
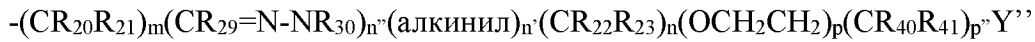
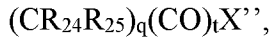
[95] Бифункциональные сшивающие агенты, которые обеспечивают соединение связывающегося с клетками агента и цитотоксических соединений через дисульфидную связь, известны в данной области и включают *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) для введения дитиопиридилных групп. Другие бифункциональные сшивающие агенты, которые можно использовать для введения дисульфидных групп, известны в данной области и описаны в Патентах США 6913748, 6716821 и публикациях патентных заявок США 20090274713 и 20100129314, все включены в настоящее описание посредством ссылки. Альтернативно также могут быть использованы такие сшивающие агенты, как 2-иминотиолан, гомоцистеин тиолактон или *S*-ацетилсукциновый ангидрид, которые вводят тиольные группы.

[96] "**Линкер**", "**линкерный фрагмент**" или "**соединительная группа**" здесь обозначает фрагмент, соединяющий вместе две группы, такие как связывающийся с клетками агент и цитотоксическое вещество. Обычно линкер в существенной степени инертен в условиях, для которых связаны две соединяемые им группы. Бифункциональный сшивающий агент может содержать две реакционноспособные группы, по одной на каждом конце линкерного фрагмента, таким образом, что одна реакционноспособная группа может сначала прореагировать с цитотоксическим соединением с получением соединения, несущего линкерный фрагмент, и вторая реакционноспособная группа может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом. Альтернативно один конец бифункционального сшивающего агента может сначала прореагировать со связывающимся с клетками агентом с получением вещества, несущего линкерный фрагмент, и вторая реакционноспособная группа может затем реагировать с цитотоксическим соединением. Линкерный фрагмент может содержать химическую связь, позволяющую высвобождение цитотоксического фрагмента в определенном месте. Подходящие химические связи хорошо известны в данной области техники и включают дисульфидные связи, тиоэфирные связи, кислотно-лабильные связи, фотоллабильные связи, пептидазо-лабильные связи и эстеразо-лабильные связи (см. напр. Патенты США 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 и 7414073). Предпочтительны дисульфидные связи, тиоэфирные и пептидазо-лабильные связи. Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают нерасщепляемые линкеры, такие как описанные в публикации патентной заявки США № 20050169933, или же заряженные или гидрофильные линкеры,

описанные в документах US 2009/0274713, US 2010/01293140 и WO 2009/134976, каждая из которых положительно образом включена в настоящее описание посредством ссылки.

[97] В одном варианте реализации соединительная группа с реакционноспособной группой на одном конце, такой как реакционноспособный сложный эфир, выбрана из следующих:





где:

m, n, p, q, m', n', t' являются целыми числами от 1 до 10, или являются
необязательно 0;

$t, m'', n'',$ и p'' являются 0 или 1;

X'' выбран из $\text{OR}_{36}, \text{SR}_{37}, \text{NR}_{38}\text{R}_{39}$, где $\text{R}_{36}, \text{R}_{37}, \text{R}_{38}, \text{R}_{39}$ являются H, или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, имеющим от 1 до 20 атомов углерода и/или полиэтиленгликолевой единицей $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, R_{37} , необязательно, является тиольной защитной группой при $t = 1$, COX'' образует реакционноспособный сложный эфир, выбранный из N-гидроксисукцинимидных эфиров, N-гидроксифталиимидных эфиров, N-гидрокси-сульфо-сукцинимидных эфиров, п-нитрофенильных эфиров, динитрофенильных эфиров, пентафторфенильных эфиров и их производных, где указанные производные облегчают образование амидной связи;

Y'' отсутствует или выбран из O, S, S-S или NR_{32} , где R_{32} имеет то же определение, что приведено выше для R; или

если Y'' не является S-S и $t = 0$, то X'' выбран из малеимидной группы, галоацетильной группы или SR_{37} , где R_{37} определен так же, как выше.

A'' является аминокислотным остатком или полипептидом, содержащим от 2 до 20 аминокислотных остатков;

$\text{R}_{20}, \text{R}_{21}, \text{R}_{22}, \text{R}_{23}, \text{R}_{24}, \text{R}_{25}, \text{R}_{26}$ и R_{27} являются одинаковыми или разными и являются -H или линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 5 атомов углерода;

R_{29} и R_{30} являются одинаковыми или разными и являются -H или алкилом, имеющим от 1 до 5 атомов углерода;

R_{33} является -H или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 12 атомов углерода, полиэтиленгликолевой единицей $\text{R}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, или R_{33} является $-\text{COR}_{34}, -\text{CSR}_{34}, -\text{SOR}_{34}$, или $-\text{SO}_2\text{R}_{34}$, где R_{34} является H или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 20 атомов углерода, полиэтиленгликолевой единицей $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$; и

один из R_{40} и R_{41} необязательно является отрицательно или положительно заряженной функциональной группой, а другой является H или алкилом, алкенилом,

алкинилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода.

[98] Любая из вышеуказанных соединительных групп может содержаться в любом из соединений, соединений лекарство-линкер или конъюгатов согласно изобретению, включая замену соединительных групп любой из описанных здесь формул.

[99] Термин "**аминокислота**" обозначает аминокислоты естественного происхождения или аминокислоты неестественного происхождения. В одном варианте реализации аминокислота описана как $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}'})\text{-C(=O)OH}$, где R^{aa} и $\text{R}^{\text{aa}'}$ каждый независимо являются H, необязательно замещенным линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероарилом или гетероциклилом, или же R^{aa} и N-конечный атом азота могут вместе образовывать гетероциклическое кольцо (*напр.*, как в пролине). Термин "**аминокислотный остаток**" обозначает соответствующий остаток, когда один атом водорода устранен с аминного и/или карбоксильного конца аминокислоты, такой как $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}'})\text{-C(=O)O-}$.

[100] Термин "**катион**" обозначает ион с положительным зарядом. Катион может быть одновалентным (*напр.*, Na^+ , K^+ , и *т.д.*), двухвалентным (*напр.*, Ca^{2+} , Mg^{2+} , и *т.д.*) или мультивалентным (*напр.*, Al^{3+} и *т.д.*). Предпочтительно катион является одновалентным.

[101] Термин "**терапевтически эффективное количество**" означает такое количество активного соединения или конъюгата, которое вызывает желаемый биологический ответ у субъекта. Такой ответ включает облегчение симптомов заболевания или расстройства, подвергаемого лечению, предотвращение, подавление или задержку рецидива симптомов заболевания или самого заболевания, увеличение продолжительности жизни субъекта по сравнению с отсутствием лечения, или предотвращение, подавление или задержку в прогрессировании симптомов заболевания или самого заболевания. Определение эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники, особенно в свете приведенного здесь подробного описания. Токсичность и терапевтическая эффективность соединения I могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах и у экспериментальных животных. Эффективное количество соединения или конъюгата согласно настоящему изобретению или другого терапевтического средства для введения субъекту будет зависеть от стадии, категории и статуса множественной миеломы и характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, вес и переносимость препарата. Эффективное количество соединения или конъюгата согласно настоящему изобретению или другого терапевтического средства для введения будет также зависеть

от способа введения и лекарственной формы. Дозировку и интервал можно регулировать индивидуально, чтобы обеспечить уровни активного соединения в плазме, достаточные для поддержания желаемого терапевтического эффекта.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

[102] В первом варианте реализации настоящее изобретение относится к цитотоксическим соединениям, описанным в данном документе (*напр.*, соединения структурной формулы (I), (II), (III), (IV), (V) или (VI), или их фармацевтически приемлемые соли). В некоторых вариантах реализации цитотоксическое соединение представлено структурной формулой (I) или ее фармацевтически приемлемой солью.

[103] В некоторых вариантах реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) один из L', L'' и L''' представлен формулой (A), а другие каждый независимо представляет собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, галоген, -OH, (C₁-C₆)алкокси, или -NO₂. Более конкретно один из L', L'' и L''' представлен формулой (A), а другие представляет собой -H.

[104] В первом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) L' представлен формулой (A), а L'' и L''' представляют собой -H, а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации.

[105] Во втором конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) R_x является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH, (C₁-C₃)алкилом, (C₁-C₃)алкоксигруппой, гало(C₁-C₃)алкилом, заряженным заместителем или ионизируемой группой Q; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или для первого конкретного варианта реализации.

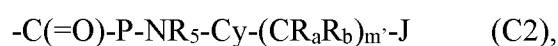
[106] В некоторых вариантах реализации Q является I) -SO₃H, -Z'-SO₃H, -OPO₃H₂, -Z'-OPO₃H₂, -PO₃H₂, -Z'-PO₃H₂, -CO₂H, -Z'-CO₂H, -NR₁₁R₁₂, или -Z'-NR₁₁R₁₂, или их фармацевтически приемлемой солью; либо II) -N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻ или -Z'-N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R₁₄ - R₁₆ каждый независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; и X⁻ представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для второго конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q является -SO₃H или его фармацевтически приемлемой солью.

[107] В третьем конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III),

(IV), (V) и (VI) J представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из NHR^{cl} , $-\text{COOH}$, и $-\text{COE}$, где $-\text{COE}$ представляет реакционноспособный сложный эфир и R^{cl} является -H является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH или $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкокси; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации, первого конкретного варианта реализации или второго конкретного варианта реализации.

[108] В некоторых вариантах реализации J является COE, выбранным из N-гидроксисукцинимидного сложного эфира, N-гидроксисульфосукцинимидного сложного эфира, нитрофенильного (*напр.*, 2 или 4-нитрофенил) сложного эфира, динитрофенильного (*напр.*, 2,4-нитрофенил) сложного эфира, сульфотетрафторфенильного (*напр.*, 4-сульфо-2,3,5,6-тетрафторфенил) сложного эфира и пентафторфенильного сложного эфира; а остальные переменные являются такими, как описано выше для третьего конкретного варианта реализации. Более конкретно COE представляет собой N-гидроксисукцинимидный сложный эфир.

[109] В четвертом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) L' представлен следующей формулой:



где:

J представляет собой $-\text{COE}$;

R_a и R_b , при каждом появлении, каждый независимо представляет собой -H, $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкил или заряженным заместителем или ионизируемой группой Q;

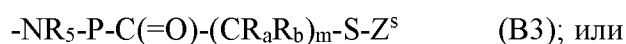
m равен целому числу от 1 до 6;

m' равен 0 или целому числу от 1 до 6;

C_y является циклическим алкилом, имеющим от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH, $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкилом, $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкоксигруппой или гало $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкилом; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго или третьего конкретного варианта реализации.

[110] В некоторых вариантах реализации R_a и R_b оба представляет собой H; S_u для формул (B2) и (C2) представляет собой циклогексан; и R_5 представляет собой H или Me; а другие переменные такие же, как описано выше для четвертого конкретного варианта реализации. Более конкретно m' в формулах (B2) и (C2) равен 0 или 1.

[111] В пятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) L' описан следующей формулой:

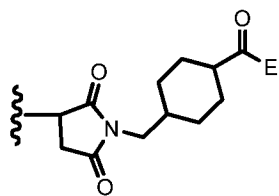


где:

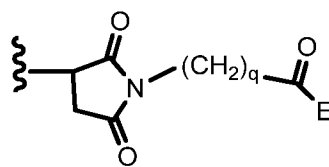
R_a и R_b , при каждом появлении, каждый независимо представляет собой $-H$, (C_1 - C_3)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

m равен целому числу от 1 до 6;

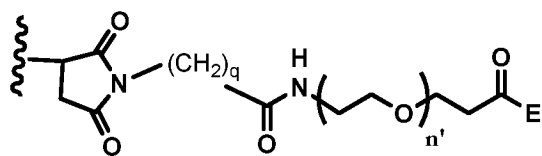
Z^s представляет собой $-H$, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ или выбран из любой из следующих формул:



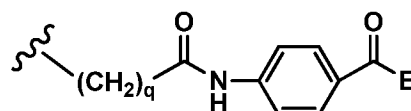
(a1');



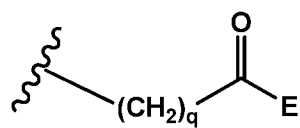
(a2');



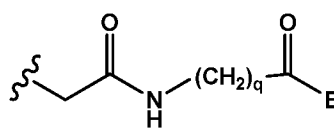
(a3');



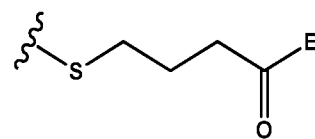
(a4');



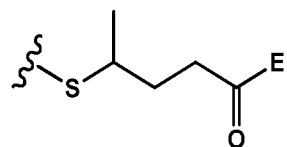
(a5');



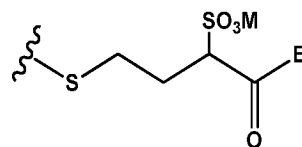
(a6');



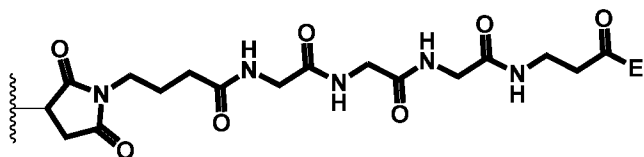
(a7');



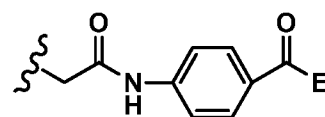
(a8');



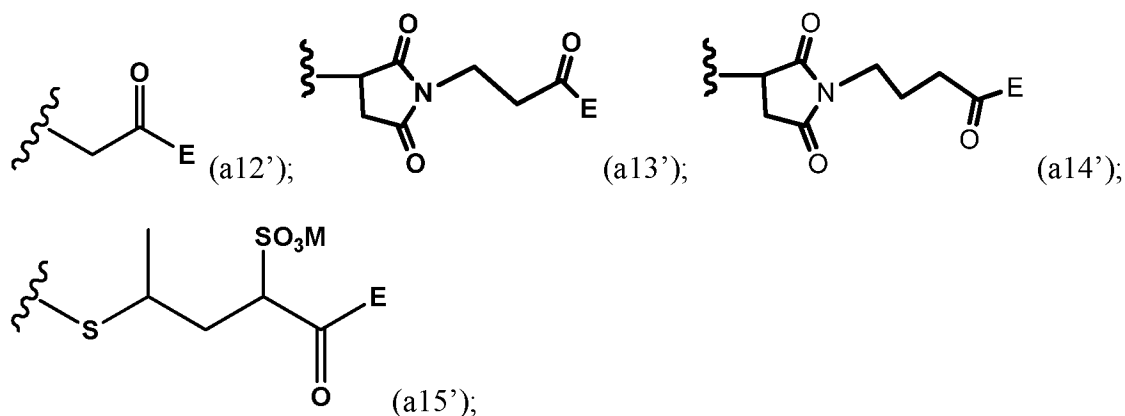
(a9);



(a10');



(a11');



где:

q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

M представляет собой катион (*напр.*, H^+ , Na^+ или K^+);

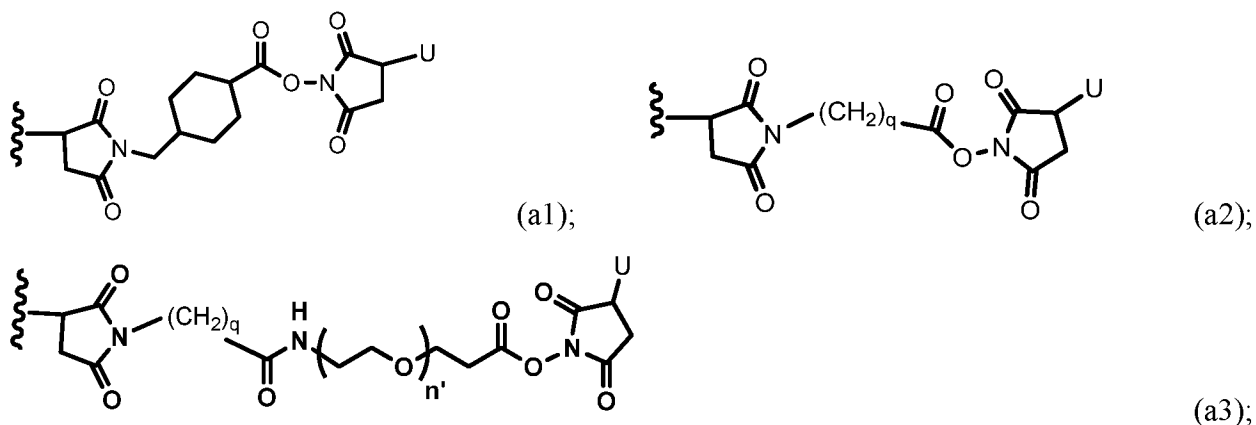
R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила (*напр.*, 2 или 4-нитрофенил), динитрофенила (*напр.*, 2,4-динитрофенил), карбоксинитрофенила (*напр.*, 3-карбокси-4-нитрофенил), пиридила или нитропиридила (*напр.*, 4-нитропиридила);

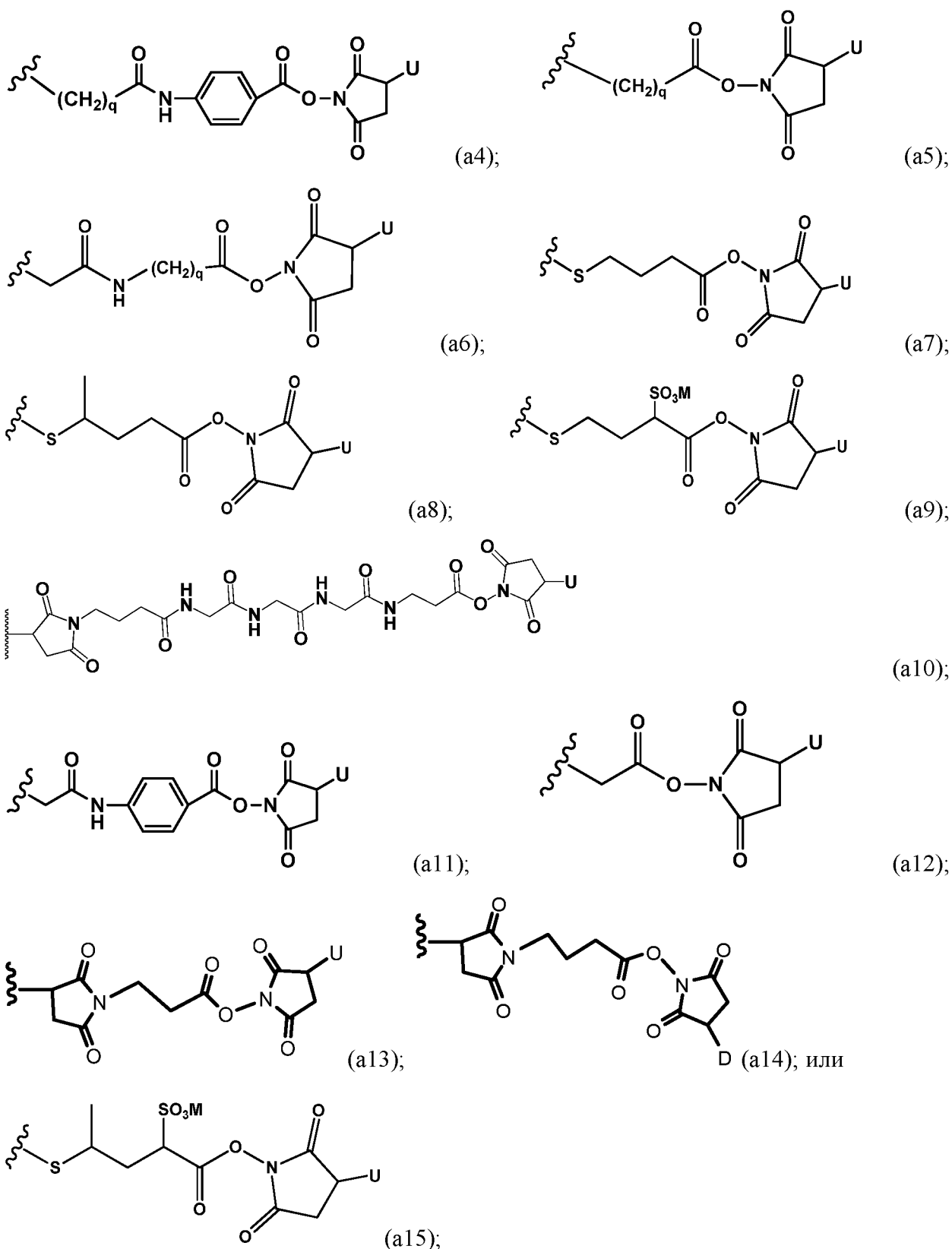
R^{d1} представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода;

а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего или четвертого конкретного варианта реализации.

[112] В одном варианте реализации Z^s представляет собой $-H$. В другом варианте реализации Z^s представляет собой $-SMe$ или $-SPy$ (Py - пиридил).

[113] В еще одном варианте реализации Z^s выбран из любой из следующих формул:





где U представляет собой -H или $-\text{SO}_3\text{M}$; а другие переменные такие же, как описано выше для формул (a1')-(a15').

[114] В некоторых вариантах реализации заряженный заместитель или ионизируемая группа Q представляет собой 1) $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{Z}'-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{Z}'-$

PO_3H_2 , $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$, или $-\text{Z}'-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$, или их фармацевтически приемлемую соль; либо II) $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ или $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14} - R_{16} каждый независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; и X^- представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой $-\text{SO}_3\text{H}$ или его фармацевтически приемлемую соль.

[115] В некоторых вариантах реализации R_a и R_b оба представляет собой $-\text{H}$ и R_5 представляет собой H или Me ; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

[116] В некоторых вариантах реализации $-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-$ представляет собой $-(\text{CH}_2)_m-$, $\text{C}(\text{Me}_2)-$ и m равен целому числу от 1 до 5; другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

[117] В шестом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) P является пептидом, содержащим от 2 до 10 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого или пятого конкретного варианта реализации.

[118] В некоторых вариантах реализации P является пептидом, содержащим от 2 до 5 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[119] В некоторых вариантах реализации P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β -Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[120] В некоторых вариантах реализации P является Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala и D-Ala-D-Ala; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[121] В седьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III),

(IV), (V) и (VI) двойная линия \equiv между N и C представляет двойную связь; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого или шестого конкретного варианта реализации.

[122] В восьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) двойная линия \equiv между N и C представляет двойную связь, X представляет собой -H или аминозащитную группу; и Y выбран из -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," необязательно замещенного 5-6-членного азотсодержащего гетероцикла, -SO₃H, -SO₂H и -OSO₃H; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого конкретного варианта реализации.

[123] В некоторых вариантах реализации, Y выбран из -H, -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt или -NHOH, где M представляет собой -H, Na⁺ или K⁺; другие переменные такие же, как описано выше для седьмого конкретного варианта реализации. Более конкретно Y представляет собой -H, -SO₃M или -OH.

[124] В девятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) X' выбран из группы, состоящей из -H, -OH, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, и фенила; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого или восьмого конкретного варианта реализации.

[125] В некоторых вариантах реализации X' представляет собой -H, -OH, (C₁-C₃)алкил, гало(C₁-C₃)алкил или фенил; другие переменные такие же, как описано выше для девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно X' представляет собой -H, -OH или -Me. Еще более конкретно X' представляет собой -H.

[126] В десятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) Y' представляет собой -H, оксогруппу, (C₁-C₃)алкил или гало(C₁-C₃)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого или девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно Y' представляет собой -H или оксогруппу. Еще более конкретно Y' представляет собой H.

[127] В одиннадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI), A и A' являются одинаковыми или разными и выбраны из -O-, -S-, -NR₅- и оксогруппы -(C=O)-; другие переменные такие же, как описано выше для первого

варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого конкретного варианта реализации. Более конкретно А и А' являются одинаковыми или разными и выбраны из -О- или -S- Еще более конкретно А и А' представляют собой -О-.

[128] В двенадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI), R₆ представляет собой -ОМе; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или одиннадцатого конкретного варианта реализации.

[129] В тринадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI), R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' и R₄' представляют собой независимо -Н, галоген, -NO₂, -ОН, (C₁-C₃)алкил, гало(C₁-C₃)алкил или (C₁-C₃)алкоксигруппу; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или

двенадцатого конкретного варианта реализации. Более конкретно, R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' и R₄' все представляют собой -Н.

[130] В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) R, R', R'' и R₅ каждый независимо представляет собой -Н или (C₁-C₃)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого конкретного варианта реализации.

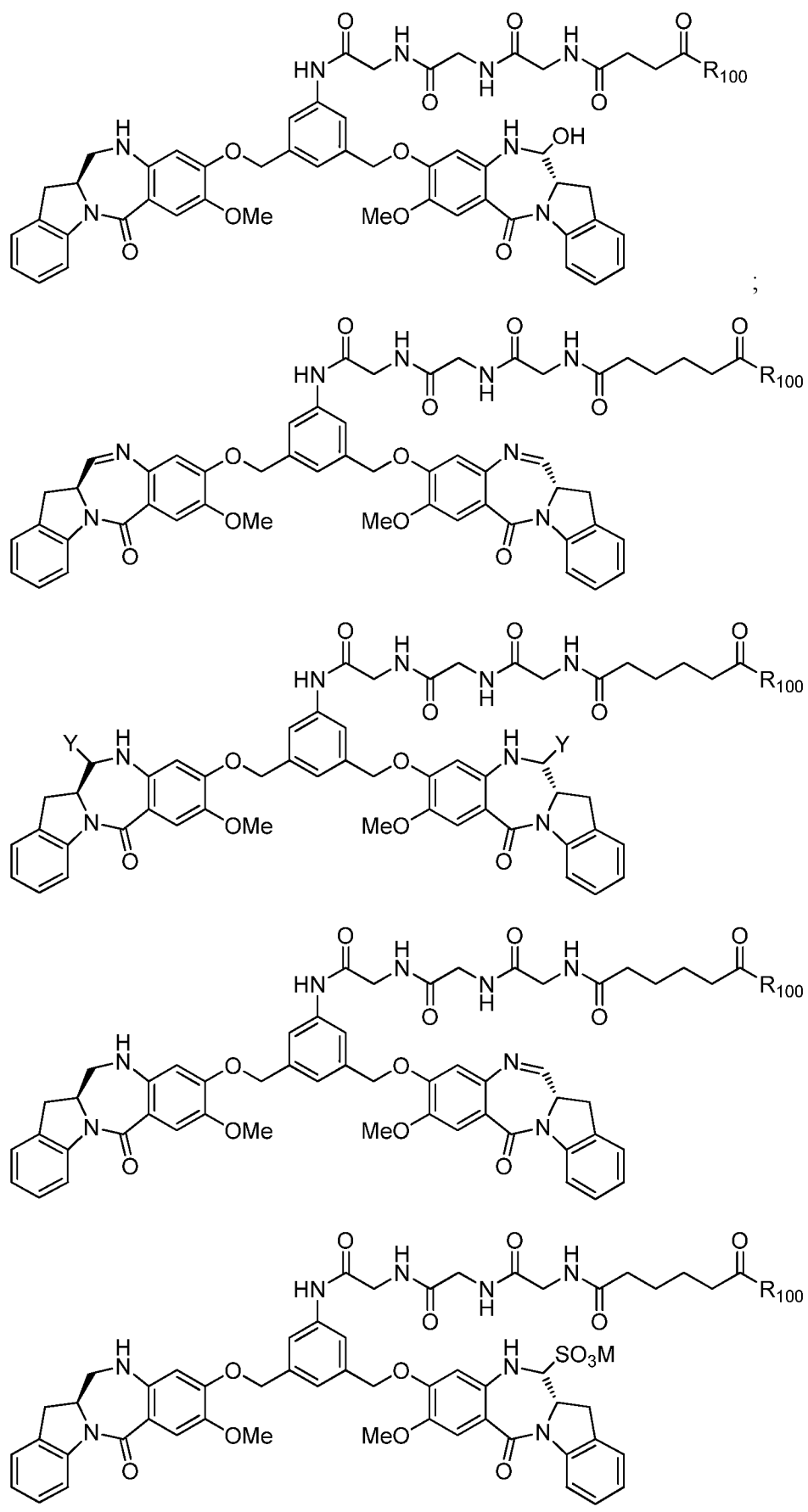
[131] В пятнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I), (II), (III), (IV), (V) и (VI) двойная линия == между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь, при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой -Н, а если это одинарная связь, то X представляет собой -Н, Y представляет собой -ОН или -SO₃M;

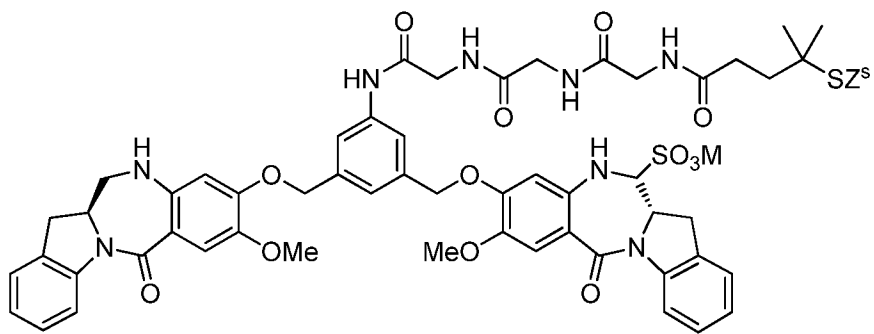
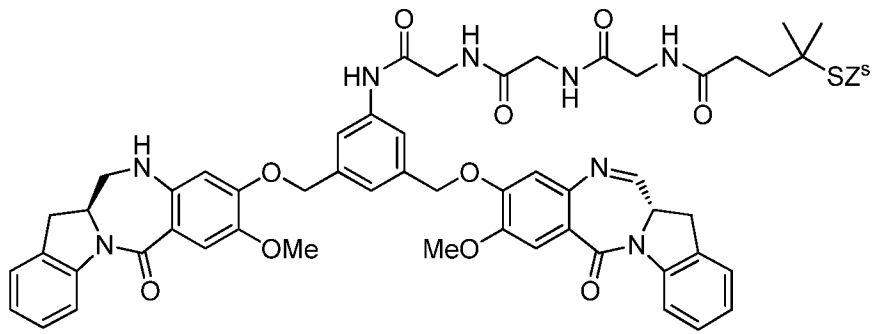
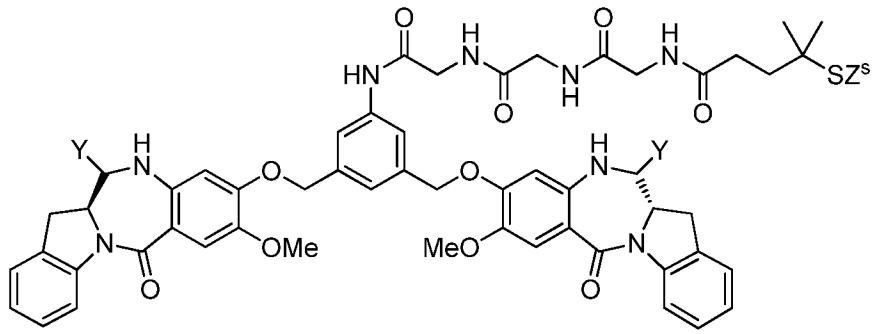
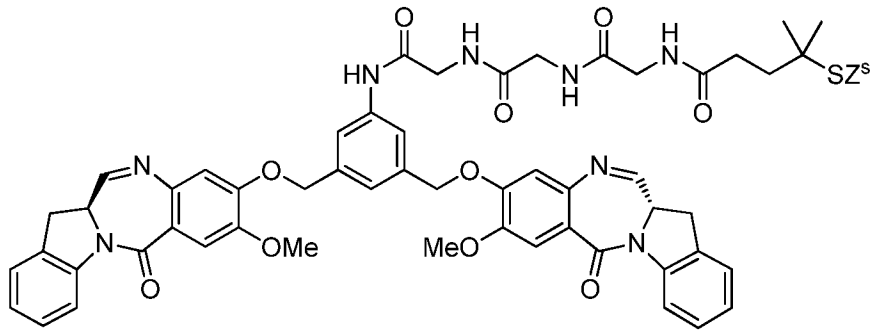
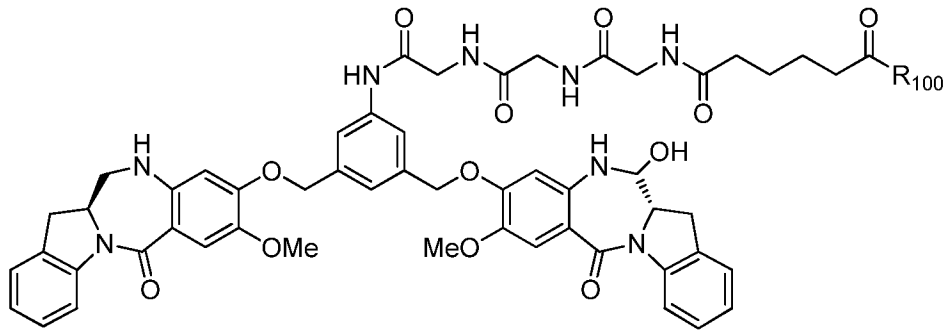
R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' и R₄' все представляют собой -Н;

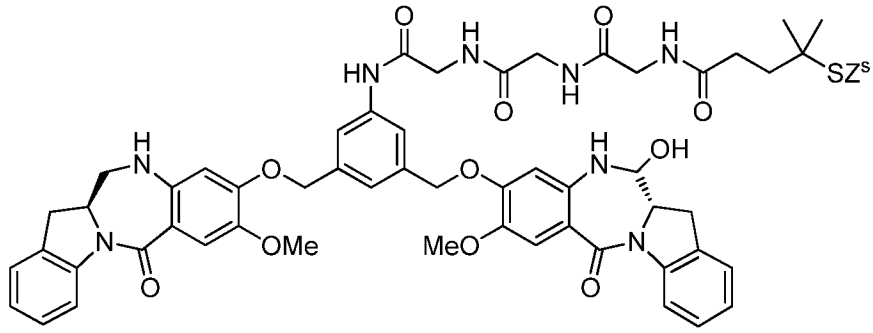
R₆ представляет собой -ОМе;

X' и Y' оба представляют собой -Н;

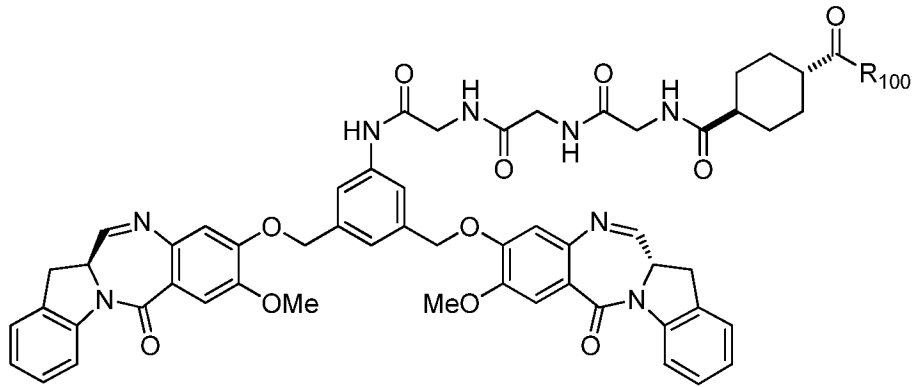
А и А' представляют собой -О-;



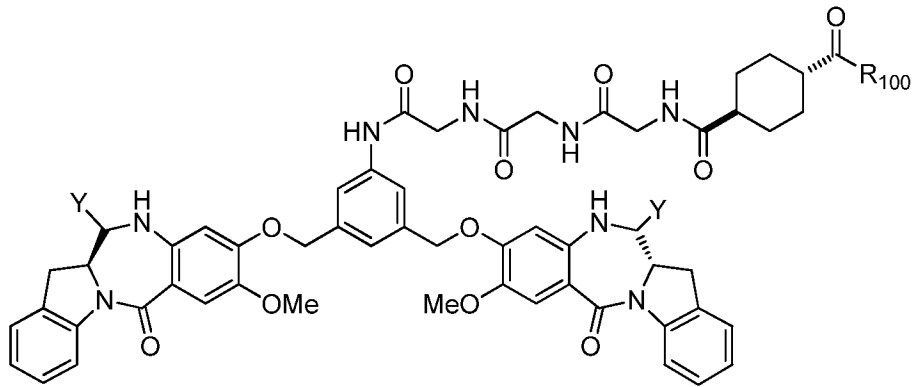




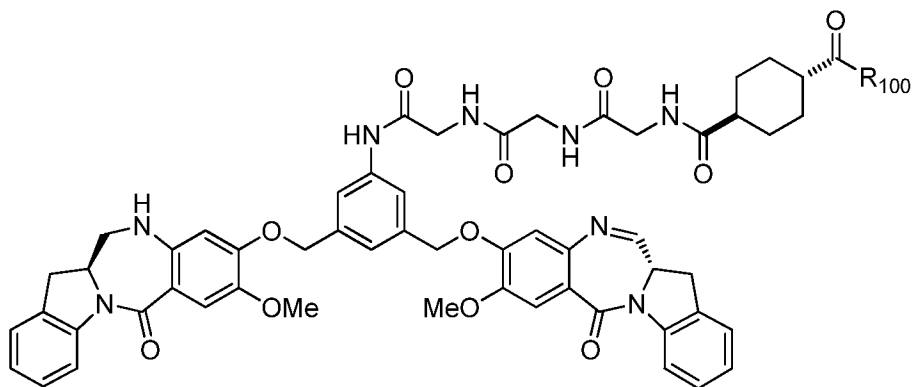
;



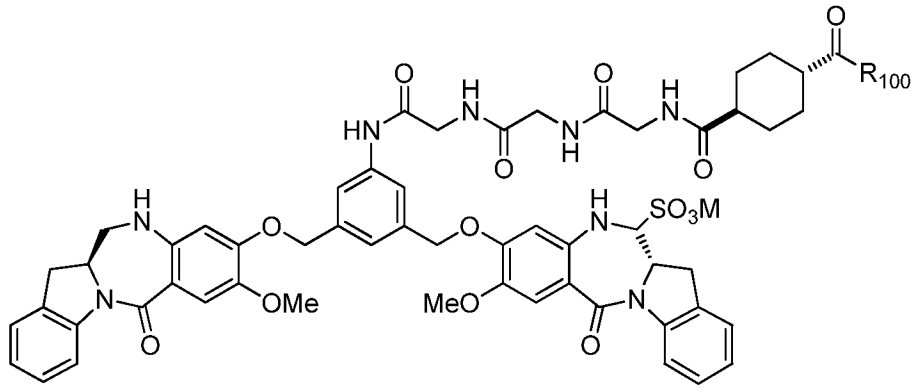
;



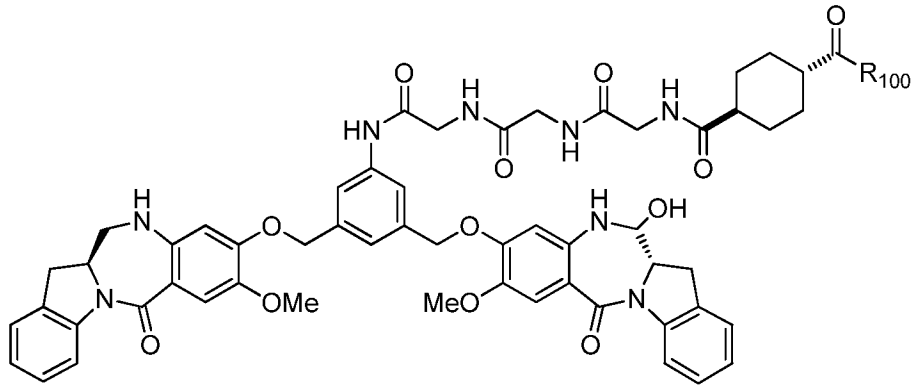
;



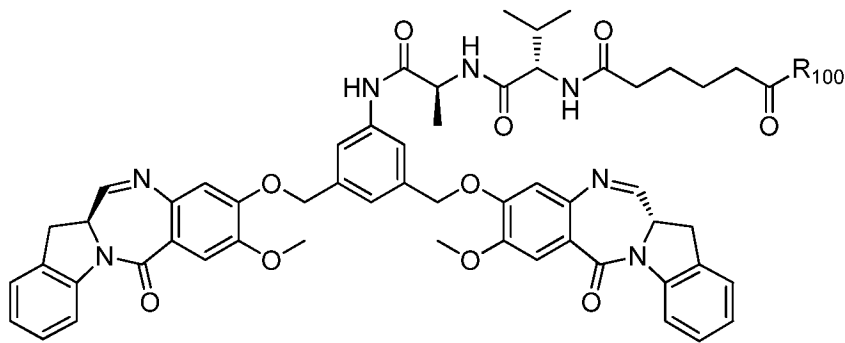
;



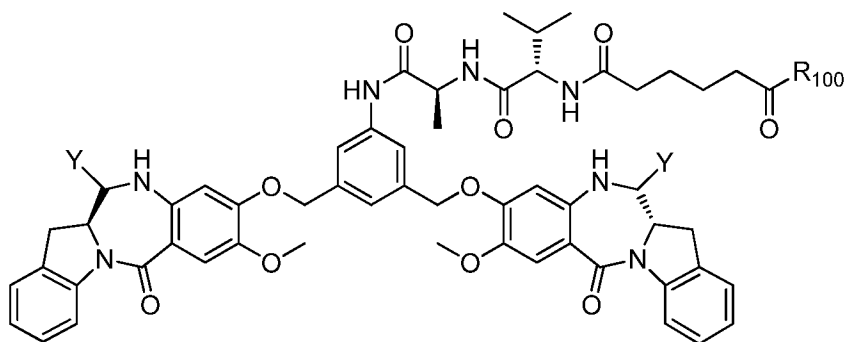
;



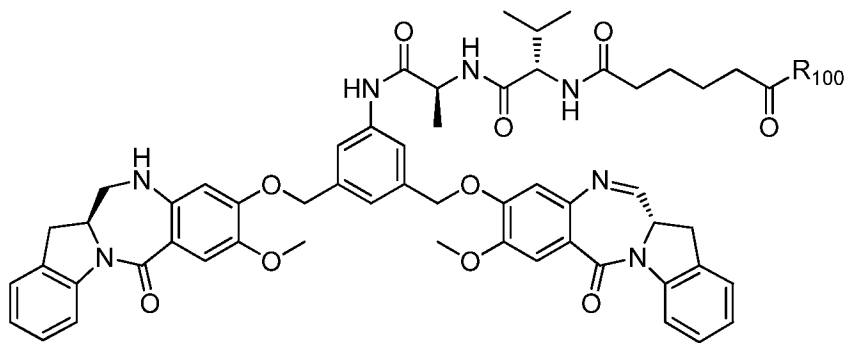
;



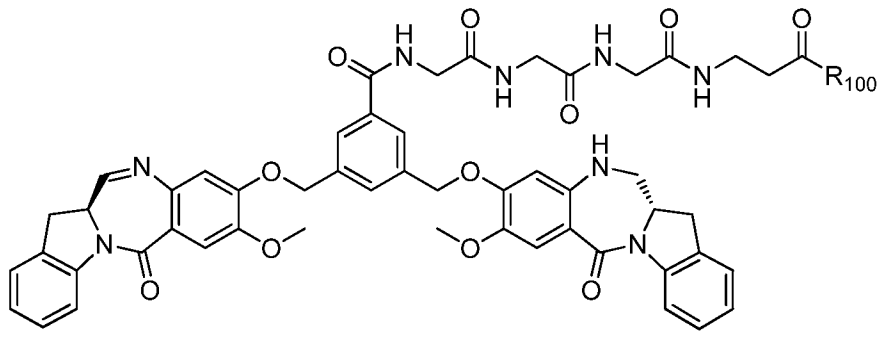
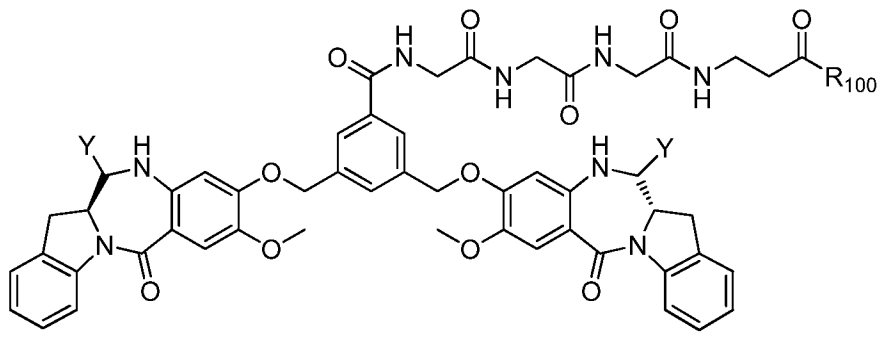
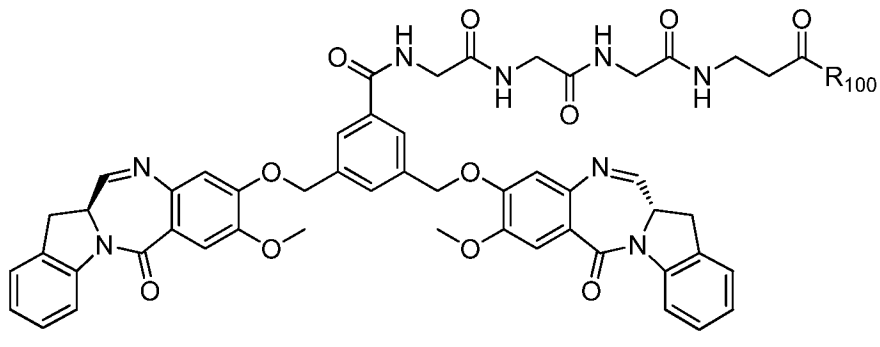
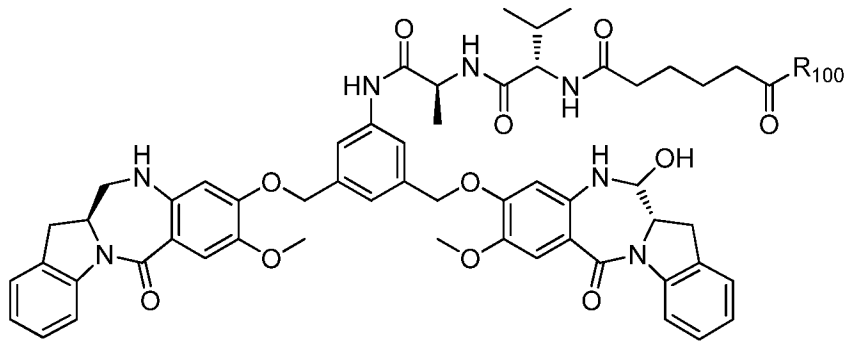
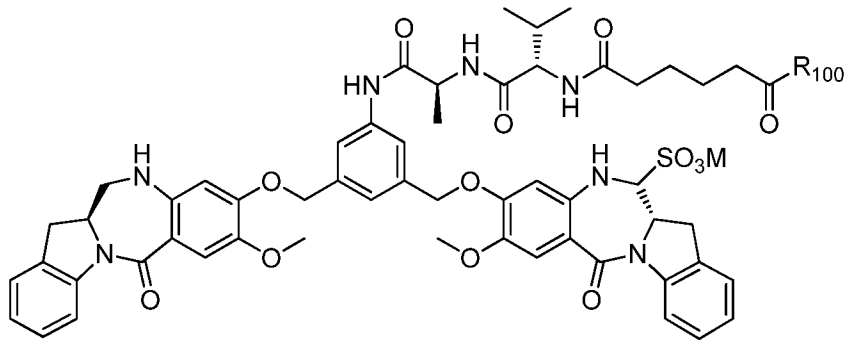
;

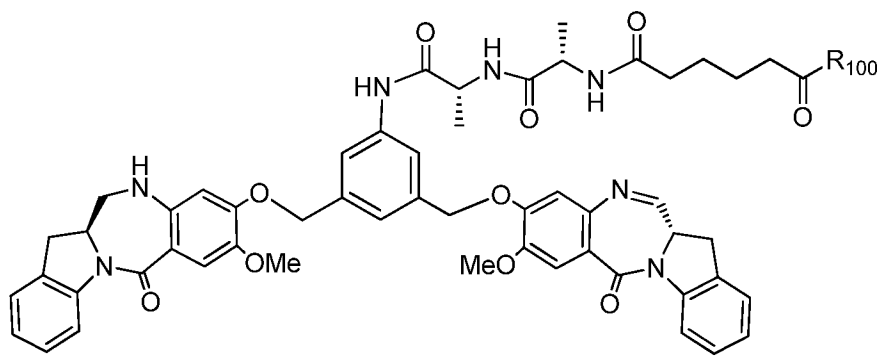
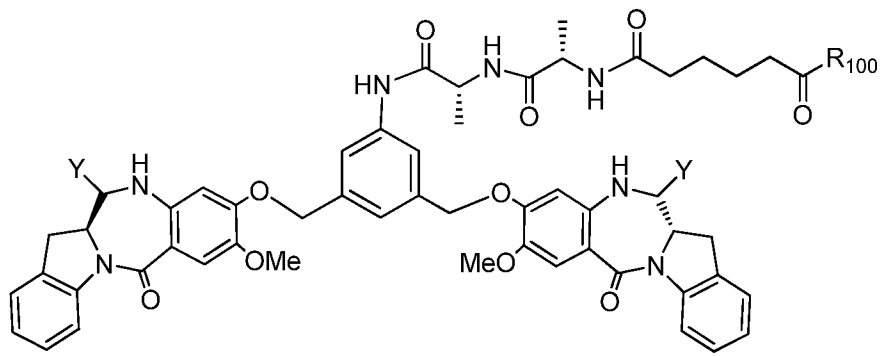
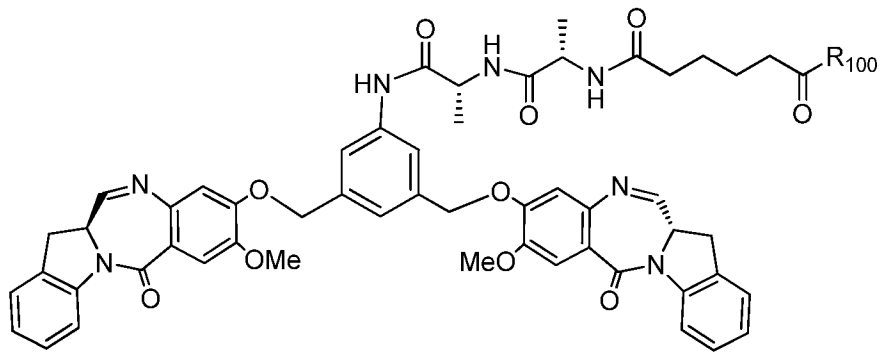
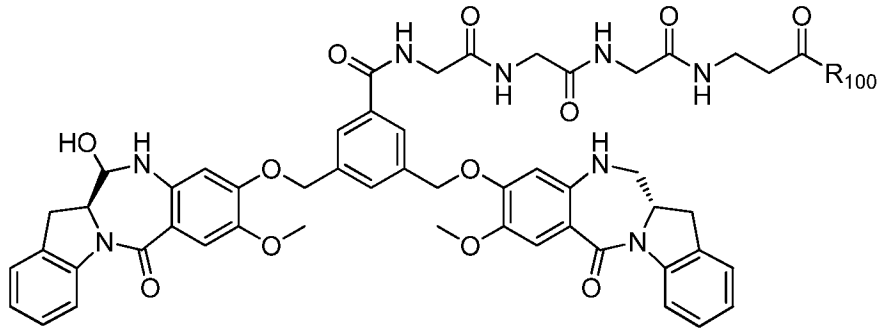
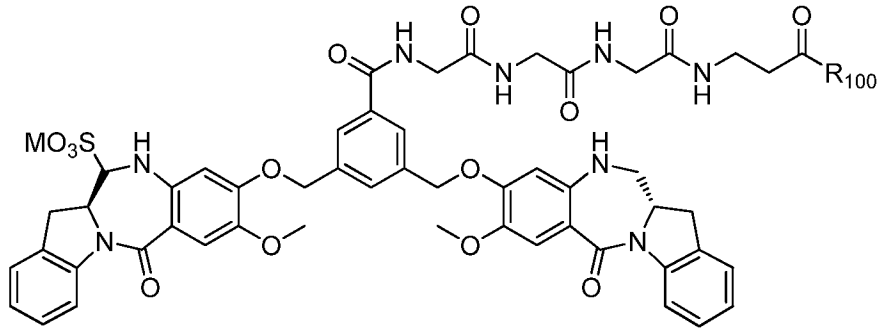


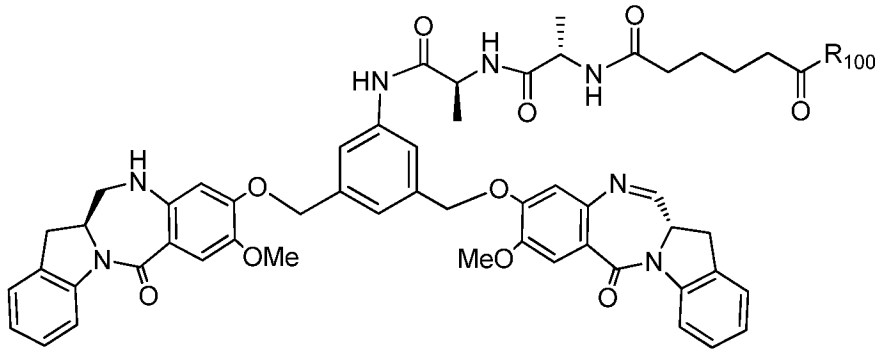
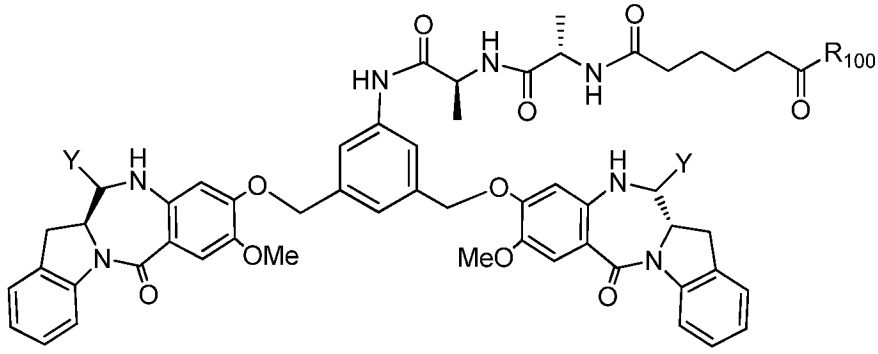
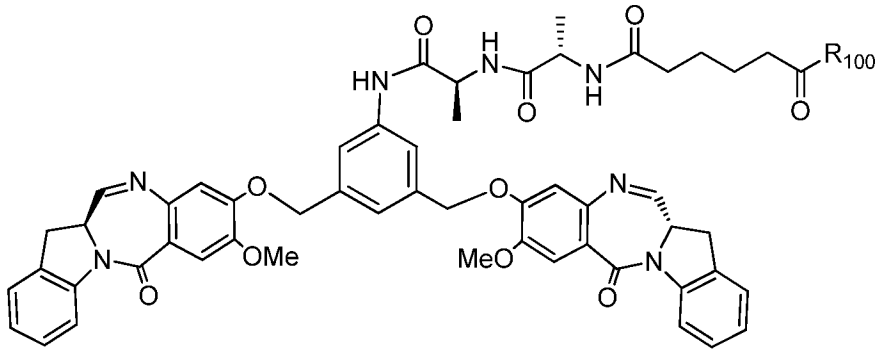
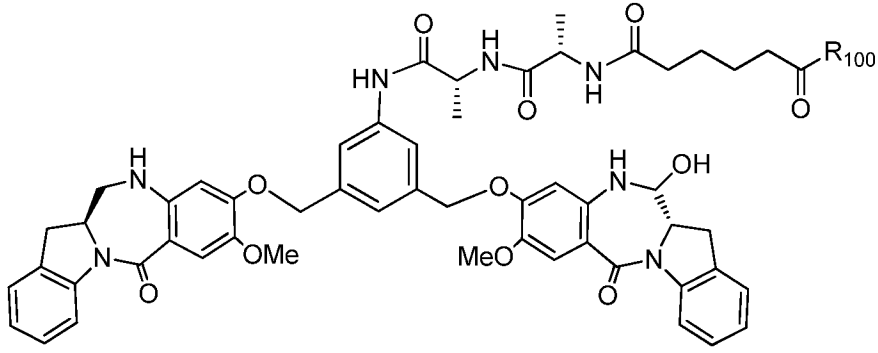
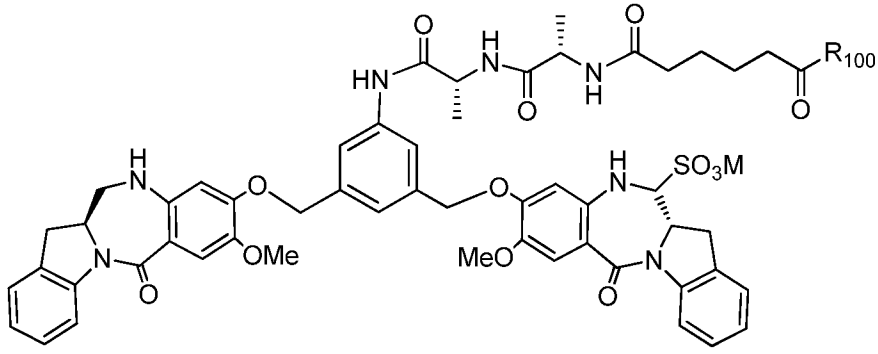
;

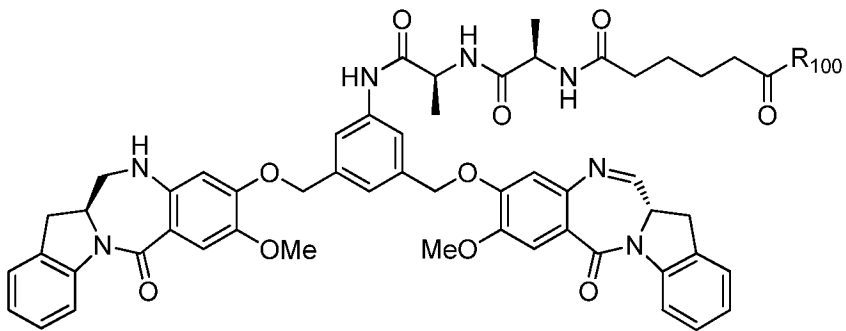
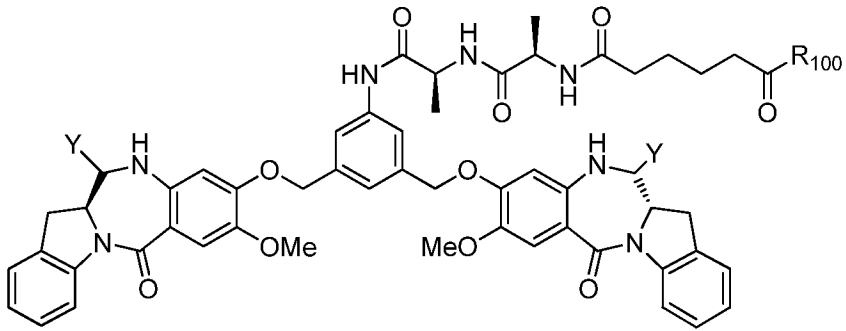
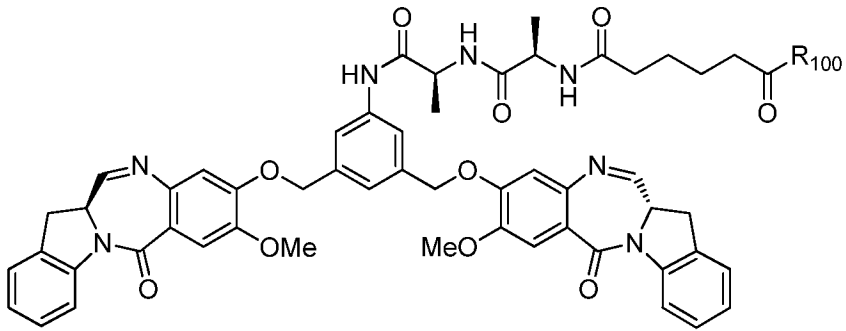
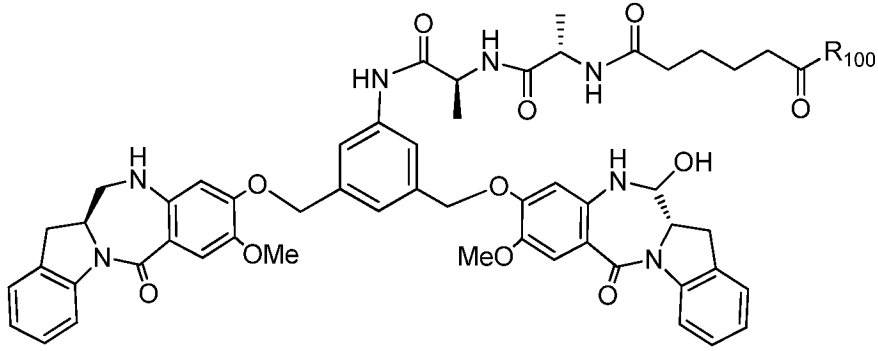
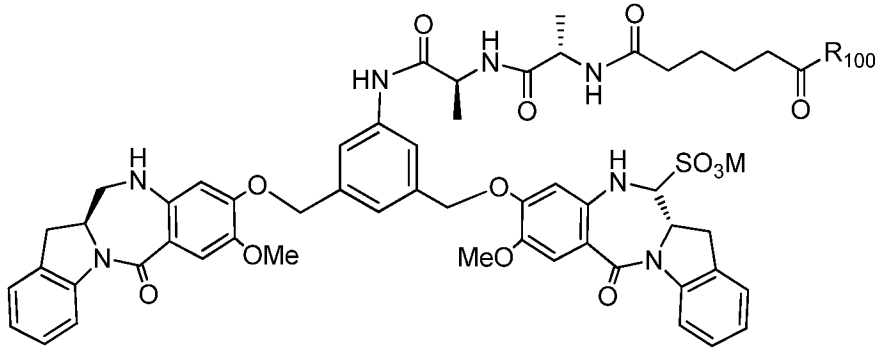


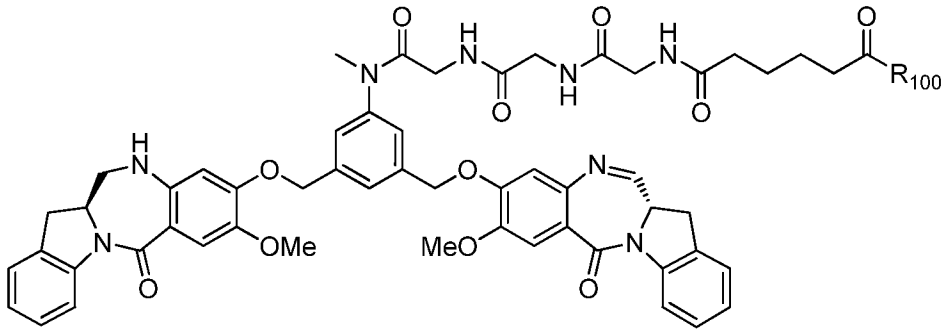
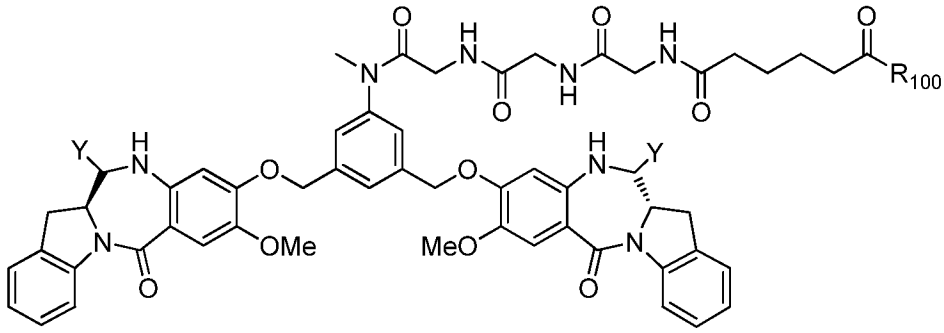
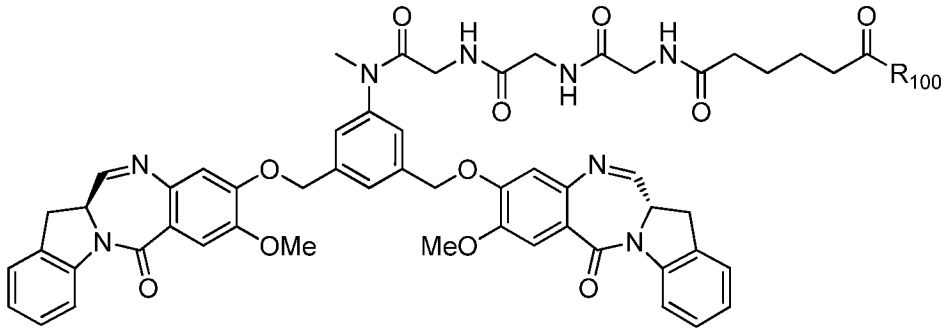
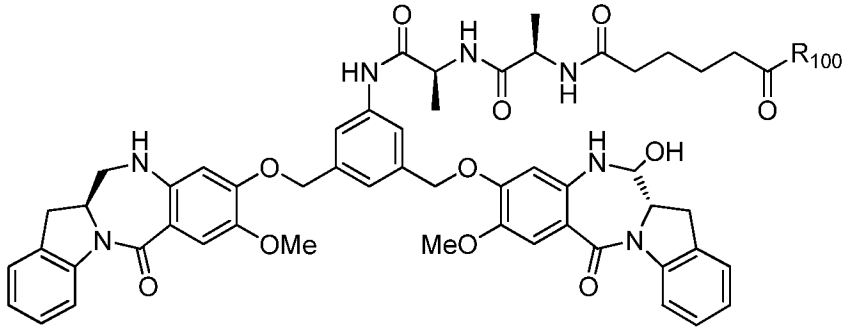
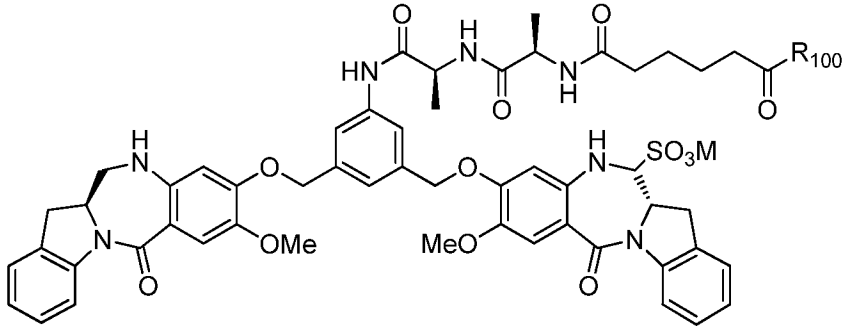
;

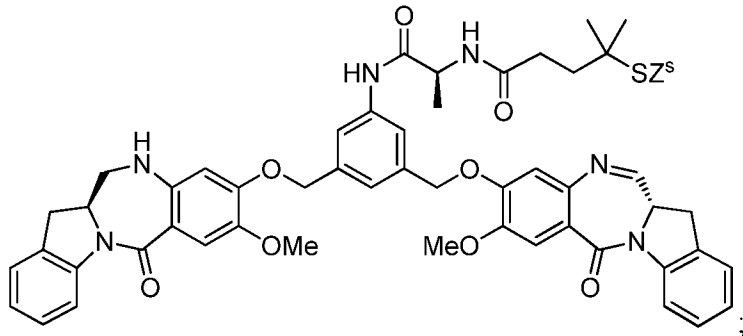
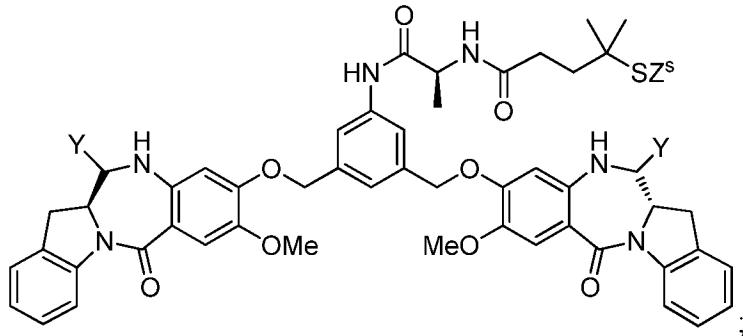
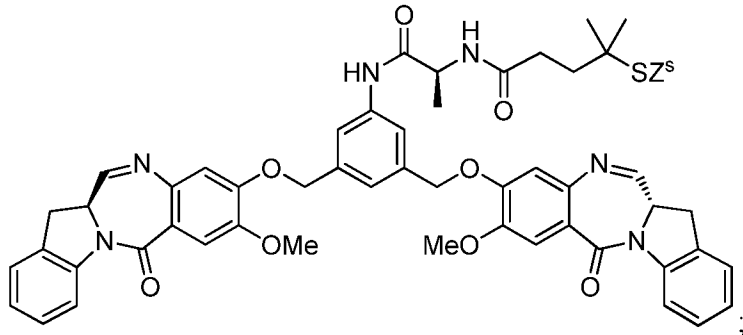
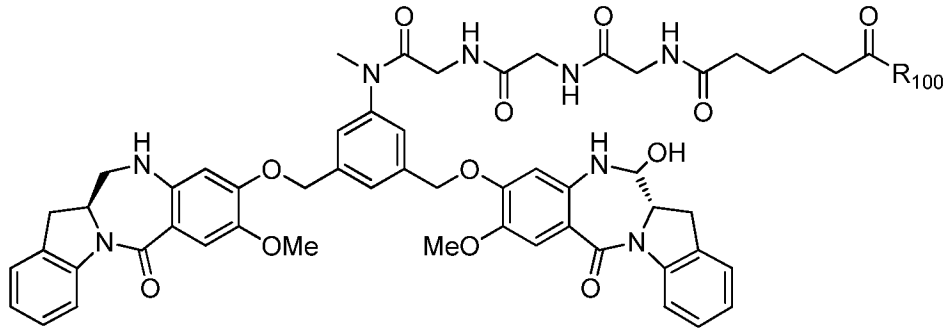
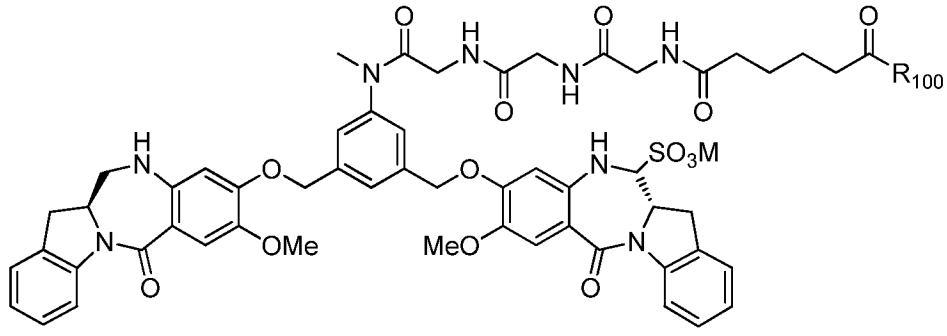


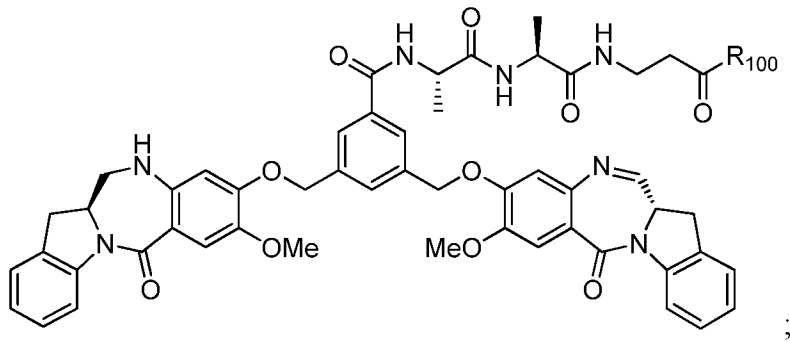
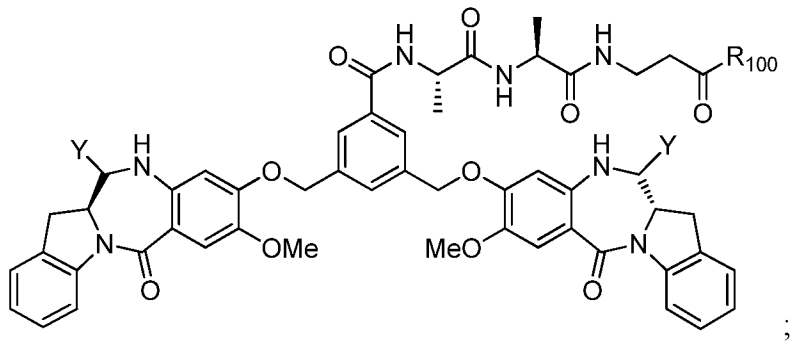
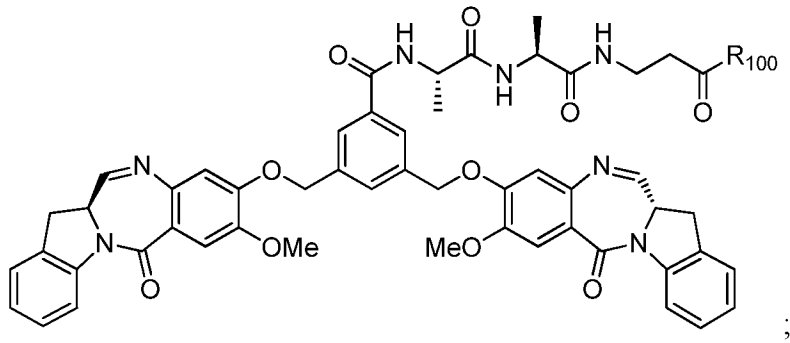
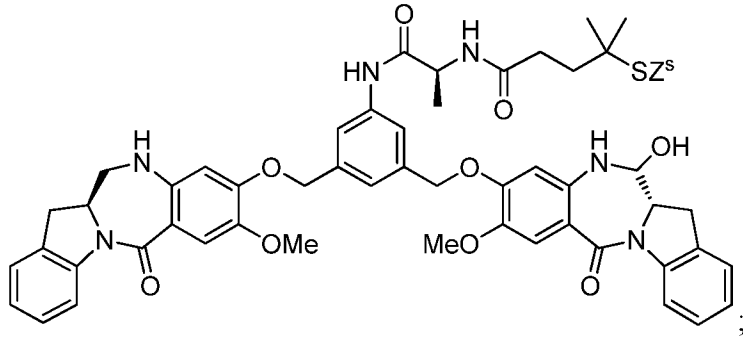
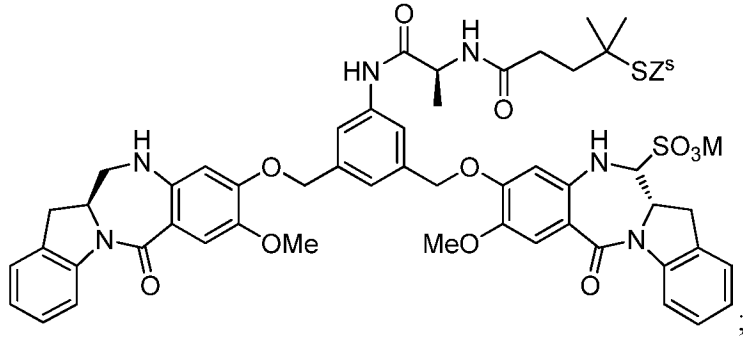


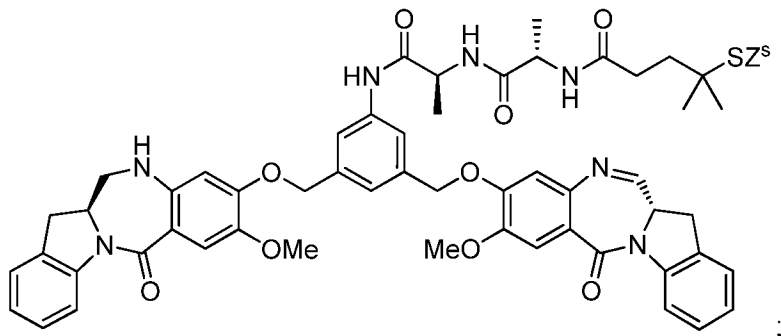
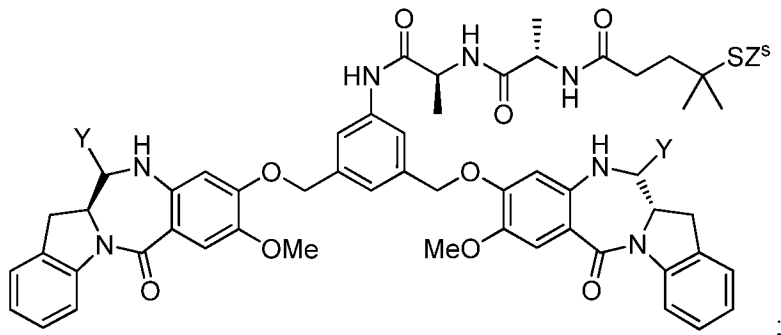
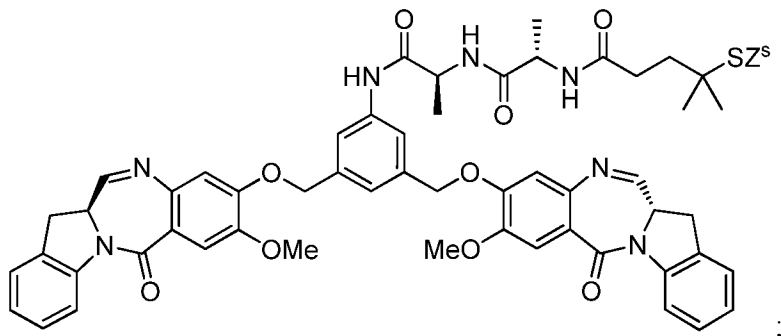
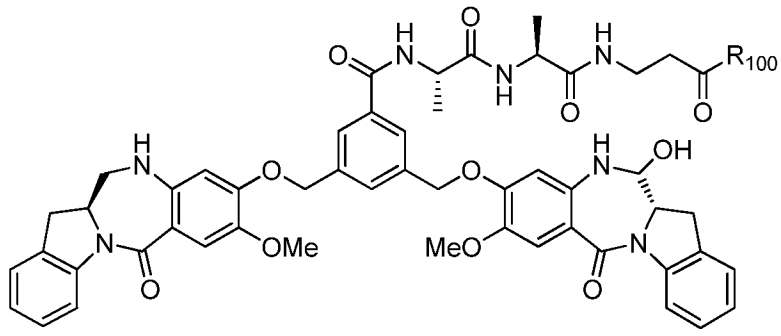
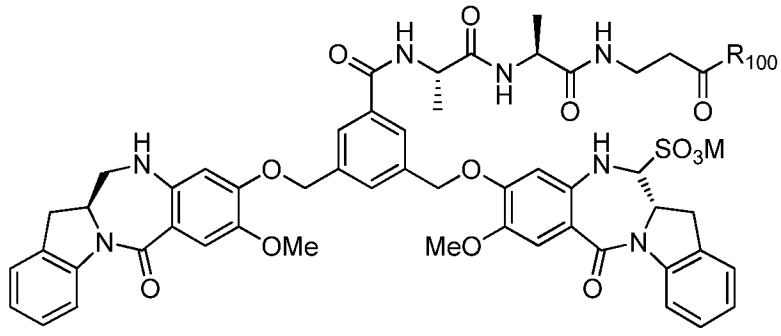


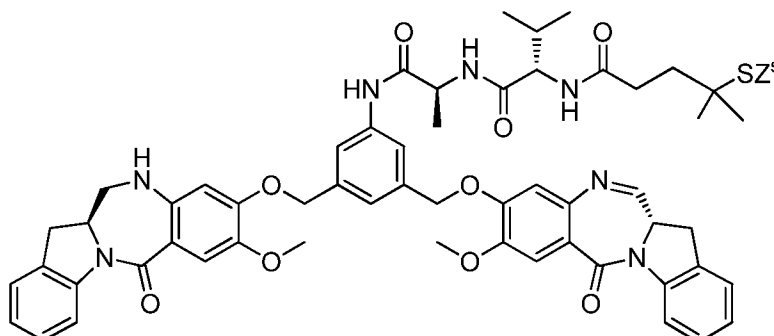
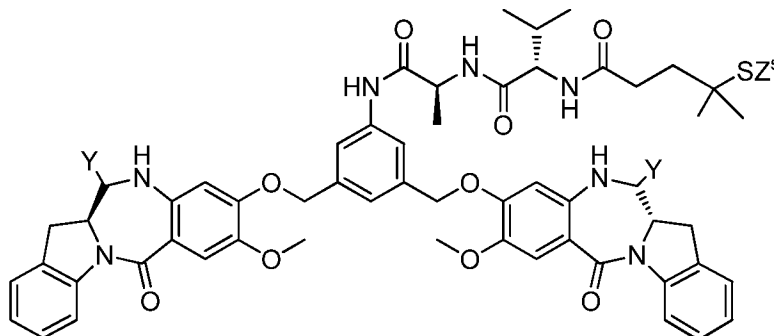
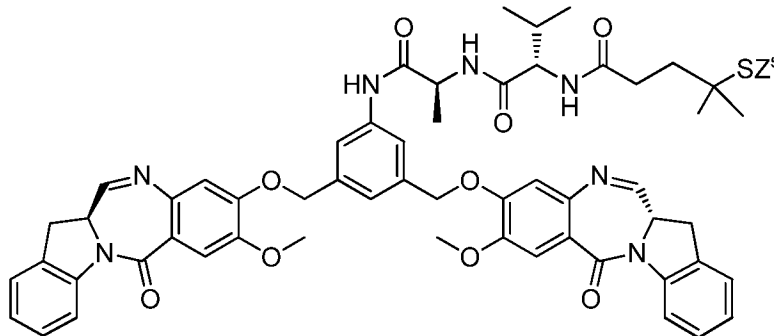
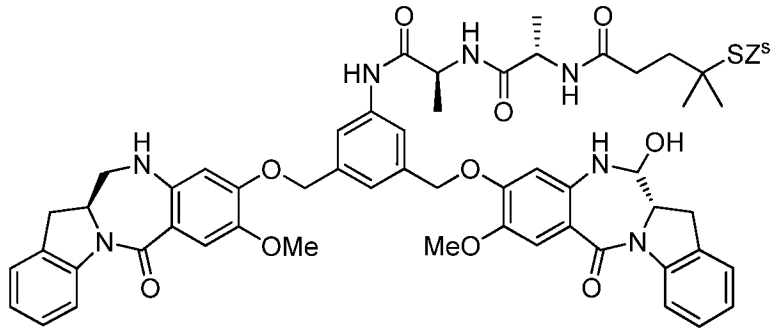
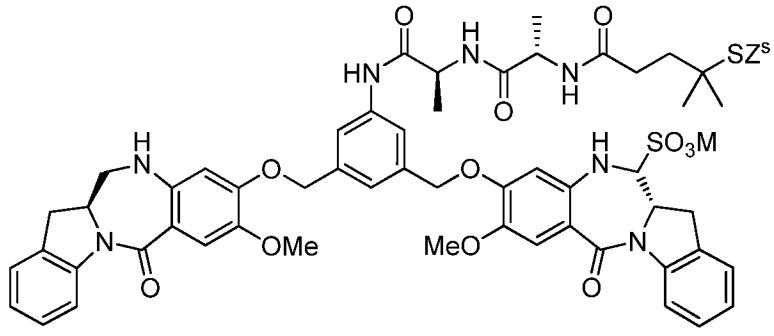


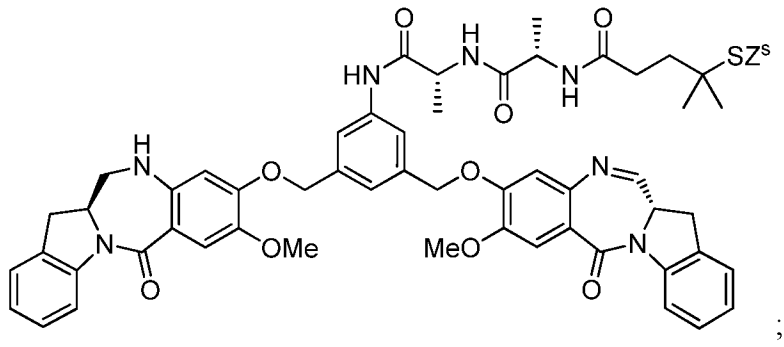
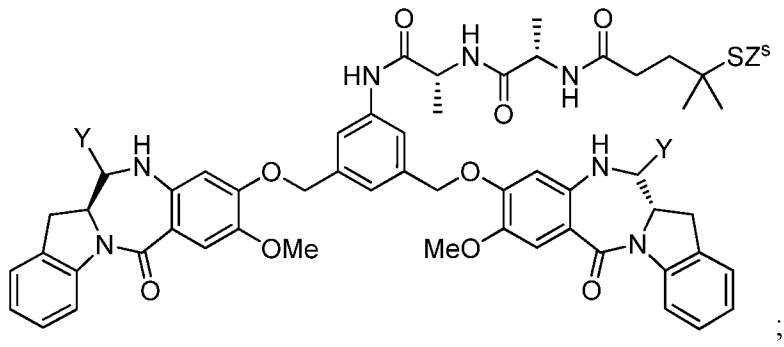
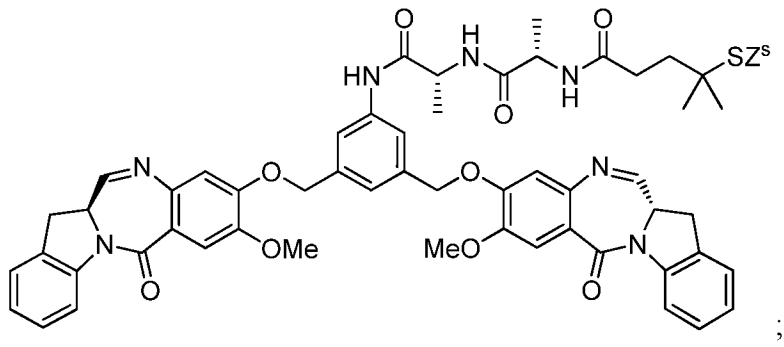
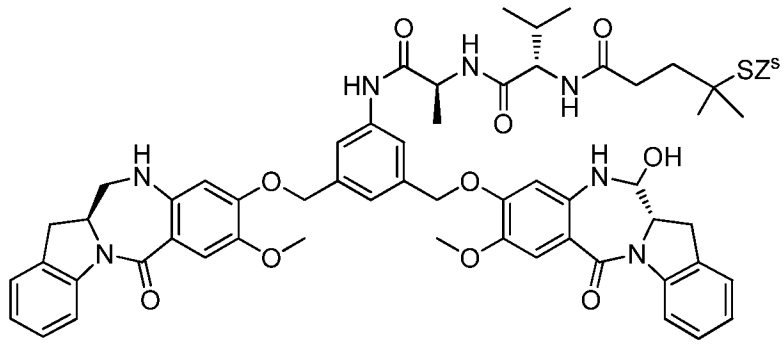
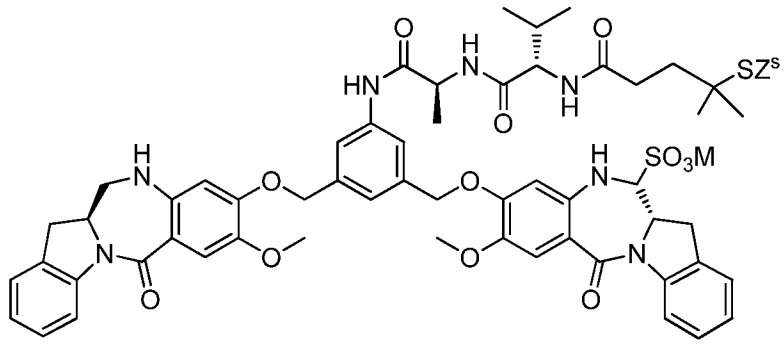


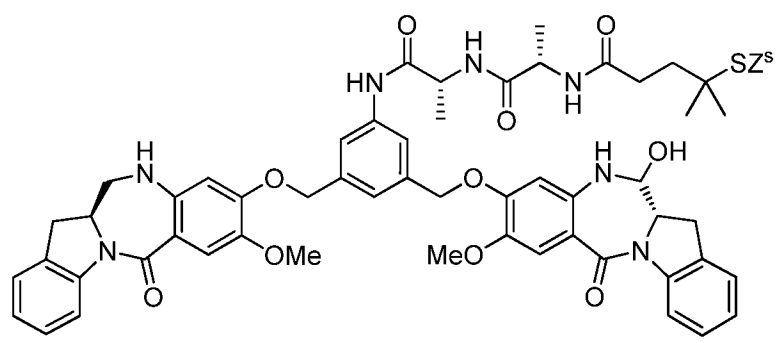
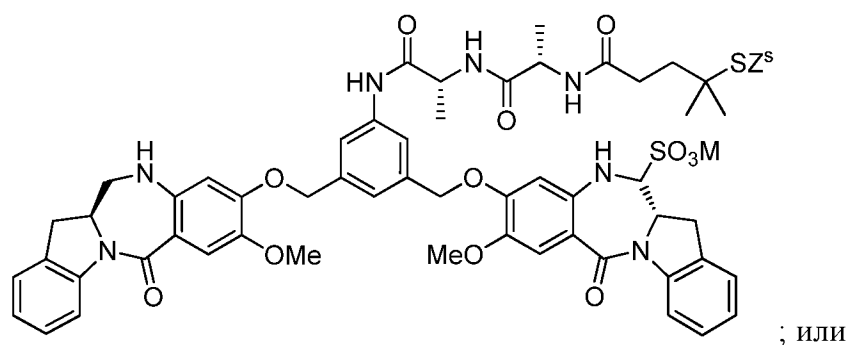




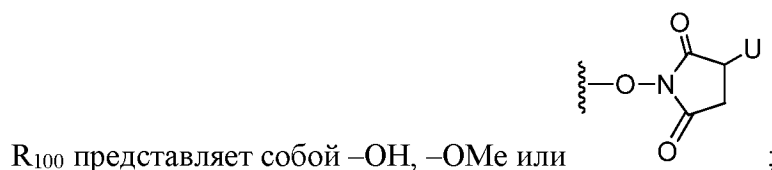








или его фармацевтически приемлемой соли, где:



Y представляет собой $-\text{H}$, $-\text{OH}$ или $-\text{SO}_3\text{M}$; и

M представляет собой фармацевтически приемлемый катион (*напр.*, H^+ , Na^+ или K^+);

Z^s является $-\text{H}$, $-\text{SR}^d$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{d1}$ или выбран из описанных выше формул (a1')-(a15').

[133] В конкретном варианте реализации Z^s выбран из описанных выше формул (a1')-(a15').

[134] В более конкретном варианте реализации Z^s выбран из формул (a7), (a8), (a9) и (a15). В еще более конкретном варианте реализации Z^s представлен формулой (a9). Альтернативно, Z^s представлен формулой (a7).

[135] В другом конкретном варианте реализации Z^s представляет собой $-\text{H}$.

[136] В другом конкретном варианте реализации Y представляет собой $-\text{SO}_3\text{M}$. Альтернативно Y представляет собой $-\text{OH}$.

[137] Кроме того, в настоящем изобретении включены метаболиты любых цитотоксических соединений или конъюгатов "связывающийся с клетками агент-цитотоксическое вещество", описанных в настоящем документе.

СИНТЕЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

[138] Цитотоксические соединения согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены согласно методам, описанным в патенте США № 8765740 и публикации патентной заявки США № 2012/0238731.

[139] Типичные способы получения цитотоксических димерных соединений по настоящему изобретению представлены в примерах 1-10.

СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С КЛЕТКАМИ АГЕНТЫ

[140] Эффективность конъюгатов согласно изобретению в качестве терапевтических агентов зависит от тщательного подбора соответствующего связывающегося с клетками агента. Связывающиеся с клетками агенты могут быть любого вида из известных в настоящее время, или становящихся известными, в том числе пептидами и непептидными веществами. Как правило, это могут быть антитела (такие как поликлональные антитела и моноклональные антитела, особенно моноклональные антитела), лимфокины, гормоны, факторы роста, витамины (такие как фолат *и т.д.*, которые могут связываться с рецептором на клеточной поверхности, *напр.*, фолатным рецептором), транспортные молекулы для питательных веществ (такие как трансферрин), или любые другие связывающиеся с клетками молекулы или вещества.

[141] Подбор подходящего связывающегося с клетками агента является вопросом выбора, который частично зависит от конкретного варианта таргетной клеточной популяции, однако во многих (но не всех) случаях человеческие моноклональные антитела являются хорошим выбором, если доступен их надлежащий вид. Например, моноклональное антитело MY9 представляет собой мышинное антитело IgG₁, которое специфически связывается с антигеном CD33 (J.D. Griffin *et al.*, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984)), и может быть использовано, если клетки-мишени экспрессируют CD33, как при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ).

[142] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент не является белком. Например, в некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент может быть витамином, связывающимся с витаминным рецептором, таким как рецептор на клеточной поверхности. В этом отношении витамин А связывается с ретинол-связывающим белком (РСБ) с образованием комплекса, который в свою очередь

связывает рецептор STRA6 с высокой аффинностью и увеличивает всасывание витамина А. В другом примере фолиевая кислота/фолат/витамин В₉ связывает фолатный рецептор на поверхности клетки (FR), *напр.*, FR α , с высокой аффинностью. Фолиевая кислота или антитела, которые связываются с FR α , могут быть использованы для нацеливания на фолатные рецепторы, экспрессированные на опухолях яичников и других опухолях. Кроме того, витамин D и его аналог связываются с рецептором витамина D.

[143] В других вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой белок или полипептид, или соединение, содержащее белок или полипептид, в том числе антитело, белок - не антитело или полипептид. Предпочтительно белок или полипептиды содержат один или несколько остатков Lys в -NH₂ группе боковой цепи. -NH₂ группы боковой цепи Lys могут быть ковалентно связаны с бифункциональными сшивающими агентами, которые, в свою очередь, связаны с димерными соединениями согласно настоящему изобретению, таким образом конъюгируя связывающиеся с клетками агенты с димерными соединениями согласно настоящему изобретению. Каждое связывающийся с клетками агент на основе белка может содержать несколько -NH₂ групп боковой цепи Lys, доступных для связывания соединений согласно изобретению с помощью бифункциональных сшивающих агентов.

[144] В одном варианте реализации, GM-CSF, лиганд/фактор роста, который связывается с миелоидными клетками, может быть использован в качестве связывающегося с клетками агента для больных клеток при остром миелоидном лейкозе. ИЛ-2, который связывается с активированными Т-клетками, может быть использован для профилактики отторжения трансплантата, для лечения и профилактики болезни "трансплантат против хозяина", а также для лечения острого Т-клеточного лейкоза. MSH, который связывается с меланоцитами, может быть использован для лечения меланомы, как и антитела к меланомам. Эпидермальный фактор роста может быть использован для нацеливания на плоскоклеточные раки, такие как рак легких и головы и шеи. Соматостатин может быть использован для нацеливания на нейробластомы и другие типы опухолей. Эстроген (или аналоги эстрогена) могут быть использованы для нацеливания на рак молочной железы. Андроген (или аналоги андрогена) могут быть использованы для нацеливания на семенники.

[145] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент может быть лимфокином, гормоном, фактором роста, колониестимулирующим фактором, или молекулой транспорта питательных веществ.

[146] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент является миметиком антитела, таким как белок с анкириновым повтором, центирин или аднектин/монотело.

[147] В других вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент антитела, которое специфически связывается с клеткой-мишенью, моноклональное антитело, одноцепочечное моноклональное антитело, фрагмент моноклонального антитела (или "антиген-связывающий фрагмент"), который специфически связывается с клеткой-мишенью, химерное антитело, фрагмент химерного антитела (или "антиген-связывающий фрагмент"), который специфически связывается с клеткой-мишенью, доменное антитело (*напр.*, sdAb) или фрагмент доменного антитела, который специфически связывается с клеткой-мишенью.

[148] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой гуманизированное антитело, гуманизированное одноцепочечное антитело или фрагмент гуманизированного антитела (или "антиген-связывающий фрагмент"). В конкретном варианте реализации гуманизированное антитело представляет собой huMy9-6 или другое родственное антитело, которое описано в патентах США № 7342110 и 7557189. В другом конкретном варианте реализации гуманизированное антитело представляет собой антитело против рецептора фолиевой кислоты, описанное в предварительных заявках США № 61/307797, 61/346595, и 61/413172 и заявке на патент США № 13/033723 (опубликованной как US 2012/0009181 A1). Информация из всех этих заявок включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

[149] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитело с измененной поверхностью, одноцепочечное антитело с измененной поверхностью или фрагмент антитела с измененной поверхностью (или "антиген-связывающий фрагмент"), или биспецифическое антитело.

[150] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой минитело, авитело, диатело, тритело, тетратело, нанотело, протело, доменное антитело или цельное тело.

[151] Другими словами, в качестве примера связывающийся с клетками агент может включать антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент антитела, которое специфически связывается с клеткой-мишенью, моноклональное антитело, одноцепочечное моноклональное антитело, фрагмент моноклонального антитела, которое специфически

связывается с клеткой-мишенью, химерное антитело, фрагмент химерного антитела, который специфически связывается с клеткой-мишенью, биспецифическое антитела, доменное антитело, фрагмент антитела, домен, который специфически связывается с клеткой-мишенью, интерферон (*напр.*, α , β , γ), лимфокин (*напр.*, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4 и ИЛ-6), гормон (*напр.* инсулин, высвобождающий тиротропин гормон (ВТГ), стимулирующий меланоциты гормон (МСТ) и стероидный гормон (*напр.*, андроген и эстроген), витамин (*напр.*, фолат), фактор роста (*напр.*, EGF, TGF-альфа, FGF, VEGF), колониестимулирующий фактор, молекула транспорта питательных веществ (*напр.*, трансферрин; см. O'Keefe *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260:932-937, включенный в данное описание посредством ссылки), центирин (белковый каркас на основе консенсусной последовательности повторов фибронектина типа III (FN3); см. публикации патентных заявок США 2010/0255056, 2010/0216708 и 2011/0274623, включенные в данное описание посредством ссылки), белок с анкириновыми повторами (*напр.*, спроектированный белок с анкириновыми повторами, известный как DARPin; см. публикации патентных заявок США 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146, и 2011/0224100, включенные в данное описание посредством ссылки, также см. C. Zahnd *et al.*, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605; Zahnd *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2006) 281(46):35167-35175; и Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268, включенные в данное описание посредством ссылки), белок или синтетический пептид с анкириноподобными повторами (см. *напр.*, публикации патентных заявок США 2007/0238667; патент США № 7101675; WO 2007/147213; и WO 2007/062466, включенные в данное описание посредством ссылки), аднектин (каркасный белок домена фибронектина; см. публикации патентных заявок США 2007/0082365; 2008/0139791, включенные в данное описание посредством ссылки), авитело (включая диатела, триатела и тетратела; см публикации патентных заявок США 2008/0152586 и 2012/0171115), переориентирующиеся молекулы с двойным рецептором (DART) (P.A. Moore *et al.*, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, *et al.*, *Arthritis Rheum*, 2010 Mar 30; 62(7):1933-43; Johnson S, *et al. J Mol Biol*, 2010 Apr 9;399(3):436-49), проникающих в клетку перегруженных белков (*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012), и других клеточносвязывающих молекул или веществ.

[152] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент может быть лигандом, связывающимся с фрагментом на таргетной клетке, таким как рецептор на клеточной поверхности. Например, лиганд может быть фактором роста или его фрагментом, который связывается с рецептором фактора роста; или может представлять собой цитокин или его фрагмент, который связывается с рецептором цитокина. В

некоторых вариантах реализации рецептор фактора роста или рецептор цитокина является рецептором клеточной поверхности.

[153] В некоторых вариантах реализации, в которых связывающийся с клетками агент представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент (в том числе и производные антител), или некоторые миметики антител, СКА может связываться с лигандом на клетке-мишени, таком как лиганд на поверхности клетки, в том числе рецепторы на клеточной поверхности.

[154] Конкретные примеры антигенов или лигандов могут включать в себя ренин; гормон роста (*напр.*, человеческий гормон роста и бычий гормон роста); гормон роста релизинг-фактора; паратиреоидный гормон; тиреотропный гормон; липопротеин; альфа-1-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликул-стимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; фактор свертывания крови (*напр.*, фактор VMC, фактор IX, тканевый фактор и фактор фон Виллебранда); анти-фактор свертывания крови (*напр.*, протеин С); предсердный натрийуретический фактор; поверхностно-активное вещество легкого; активатор плазминогена (*напр.*, урокиназа, моча человека или активатор плазминогена тканевого типа); бомбезин; тромбин; гемопозитический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназа; RANTES (*то есть*, регулируемый при активации, обычно экспрессируемый и секретируемый Т-клетками); человеческий макрофагальный воспалительный белок-1-альфа; сывороточный альбумин (человеческий сывороточный альбумин); мюллерово ингибирующее вещество; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; микробный белок (бета-лактамаза); ДНКаза; IgE; цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген (*напр.*, CTLA-4); ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; рецептор для гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидный фактор; нейротрофический фактор (*напр.*, костный нейротрофический фактор, нейротрофин-3, -4, -5 или -6), фактор роста нервов (*напр.*, NGF-β); фактор роста, полученный из тромбоцитов; фактор роста фибробластов (*напр.*, AFGF и bFGF); рецептор 2 фактора роста фибробластов; эпидермальный фактор роста; преобразующий фактор роста (*напр.*, TGF-альфа, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 и TGF-β5); инсулиноподобный фактор роста-I и -II; дез(1-3)-IGF-I (мозговой IGF-I); белок, связывающийся инсулиноподобный фактор роста; меланотрансферрин; ЕpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; рецептор ЕРНА; рецептор ЕрhВ; рецепторфолиевой кислоты ; FOLR1; мезотелин; крипто; альфа_vбета₆; интегрины; VEGF; VEGFR; EGFR; рецептор трансферрина; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; CD

белки (*напр.*, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD123, CD134, CD137, CD138, CD152), один или несколько опухолеассоциированных антигенов или рецепторов на клеточной поверхности (см. публикации США 2008 / 0171040 или 2008/0305044, включены во всей своей полноте посредством ссылки); эритропоэтин; остеоиндуктивный фактор; иммунотоксин; костный морфогенетический белок; интерферон (*напр.*, интерферон-альфа, -бета и -гамма); колониестимулирующий фактор (*напр.*, M-CSF, GM-CSF и G-CSF); интерлейкины (*напр.*, ИЛ-1 до ИЛ-10); супероксиддисмутаза; рецептор Т-клеток; белок поверхности мембраны; фактор ускорения распада; вирусный антиген (*напр.*, часть оболочки ВИЧ); транспортный белок, рецептор самонаведения; адрессин; регуляторный белок; интегрин (*напр.*, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM;) антиген, ассоциированный с опухолью (*напр.*, Her2, HER3 и HER4 рецептор); эндоглин; с-Met; C-kit; 1GF1R; PSGR; NGER; PSMA; PSCA; TMEFF2; LGR5; B7H4; и фрагменты любого из перечисленных выше полипептидов.

[155] Здесь и далее термин "**антитело**" включает в себя молекулы иммуноглобулинов (Ig). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое содержит четыре полипептидные цепи, а именно две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), взаимосвязанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (LCVR или VL) и константной области легкой цепи, которая состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR). Вперемежку с такими регионами находятся более консервативные каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от аминного конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, и FR4.

[156] В некоторых вариантах реализации антитело является IgG, IgA, IgE, IgD или IgM. В некоторых вариантах реализации антитело является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; или IgA1 или IgA2.

[157] В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой "антигенсвязывающий фрагмент" моноклонального антитела, разделяя с ним

последовательности, критично важные для связывания антигена с антителом (*напр.*, huMy9-6 или родственные ему антитела, описанные в патентах США 7342110 и 7557189, включенных в настоящее описание посредством ссылки).

[158] Здесь и далее термин "**антиген-связывающий фрагмент**" антитела (он же иногда взаимозаменяемо обозначен как "фрагмент антитела») охватывает один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может быть выполнена с помощью определенных фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела, включают (без ограничения): (I) фрагмент **Fab**, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1 (*напр.*, расщепленное папаином антитело распадается на три фрагмента: два антиген-связывающих Fab-фрагмента и один фрагмент Fc, который не связывается с антигеном); (II) **F(ab')₂** фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области (*напр.*, расщепленное пепсином антитело расщепляется на два фрагмента: бивалентный антиген-связывающий F(ab')₂-фрагмент и rFc'-фрагмент, который не связывает антиген) и связанная с ним **F(ab')** моновалентная единица; (III) фрагмент **Fd**, состоящий из доменов VH и CH1 (*т.е.* той части тяжелой цепи, которая включена в Fab); (IV) фрагмент **Fv**, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, и связанный с ним **дисульфидно соединенный Fv**; (V) **dAb** (доменное антитело) или **sdAb** (одиночное доменное антитело) фрагмент (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH; и (VI) изолированную область, определяющую комплементарность (**CDR**). В некоторых вариантах реализации антиген-связывающий фрагмент является **sdAb** (одиночным доменным антителом).

[159] В некоторых вариантах реализации антиген-связывающий фрагмент также включает определенные сконструированные или рекомбинантные производные (или "**антитела-производные**"), которые также включают один или более фрагментов антитела, сохраняющих способность специфически связываться с антигеном, в дополнение к элементам или последовательностям, которые могут не встречаться в антителах естественного происхождения.

[160] Например, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием стандартных методов рекомбинации через синтетический линкер, который позволяет им соединяться в одну белковую цепь, в которой VL и VH области спариваются с образованием моновалентных молекул (известны

как одноцепочечный Fv (**scFv**); см, *напр.*, Bird *et al.* Science 242:423-426, 1988: и Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988).

[161] Во всех вариантах реализации, описанных в данном документе, N-конец scFv может быть доменом VH (*m.e.* N-VH-VL-C), либо доменом VL (*m.e.*, N-VL-VH-C).

[162] Двухвалентные (или бивалентные) одноцепочечные переменные фрагменты (**диссcFv**, **би-scFv**) можно сконструировать путем соединения двух scFv. При этом получается одна пептидная цепь с двумя областями VH и двумя VL, с выходом тандемных scFv (**tascFv**). Подобным образом могут быть получены более длинные тандемные повторы, такие как три-scFv, путем соединения трех или более scFv способом "голова к хвосту".

[163] В некоторых вариантах реализации scFv могут быть связаны между собой через линкерные пептиды, которые слишком коротки (около пяти аминокислот), чтобы две переменные области свернулись вместе, таким образом принуждая scFv димеризоваться, и образуют **диатела** (см., *напр.*, Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; Poljak *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994). Диатела могут быть би-специфичными или моноспецифичными. Было показано, что константы диссоциации диател до 40 раз ниже, чем у соответствующих scFv, *m.e.*, они имеют гораздо более высокую аффинность к мишени.

[164] Еще более короткие линкеры (одна или две аминокислоты) приводят к образованию тримеров, или так называемых **триател** или **трител**. Аналогичным образом также были получены **тетратела**. Они демонстрируют еще более высокую аффинность к своим целям, чем диатела. Диатела, триатела и тетратела иногда вместе называют "связывающиеся с клетками агенты "AVIBODY™" (или короче "авитела"). Иными словами, авитела, имеющие две, три или четыре области связывания мишени (ОСМ), обычно известны как диа-, триа- и тетратела. Детальнее см., *напр.*, публикации США № 2008/0152586 и 2012/0171115, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

[165] Все эти форматы могут состоять из переменных фрагментов со специфичностью ко двум или более различным антигенам, и в этом случае они являются подтипами би- или мультиспецифичных антител. Например, определенные биспецифичные тандемные диссcFv известны как биспецифичные активаторы Т-клеток (**BiTE**).

[166] В некоторых вариантах реализации каждый scFv в тандемном scFv или диатело/триатело/тетратело могут иметь одинаковую или различную специфичность

связывания, и каждый из них может независимо друг от друга иметь N-концевой VH или N-концевой VL.

[167] Одноцепочечный Fv (scFv) также может быть слит с фрагментом Fc, таким как фрагмент Fc человеческого IgG, с получением IgG-подобных свойств, но тем не менее, они по-прежнему кодируются одним геном. Поскольку временная выработка таких белков **scFv-Fc** у млекопитающих может легко достигнуть миллиграммовых количеств, этот формат производного антитела является особенно подходящим для многих исследований.

[168] **Fcab** - это фрагменты антител, сконструированные из константной области Fc антитела. Fcab могут существовать в виде растворимых белков, или же они могут быть сконструированы обратно в полноразмерное антитело, такое как IgG, для создания **mAb2**. **mAb2** представляет собой полноразмерное антитело, на месте обычной Fc области которого находится Fcab. С помощью этих дополнительных сайтов связывания биспецифические моноклональные антитела mAb2 могут связывать две разные цели одновременно.

[169] В некоторых вариантах реализации сконструированные производные антител уменьшили размер антигенсвязывающих полученных из Ig рекомбинантных белков ("миниатюризованные" полноразмерные mAb), путем удаления доменов, считающихся несущественными для функции. Одним из лучших примеров является SMIP.

[170] **Малое модульное иммунофармацевтическое средство**, или **SMIP**, представляет собой искусственный белок, в значительной степени построенный из частей антител (иммуноглобулинов) и предназначенный для применения в качестве фармацевтического препарата. Период биологического полураспада SMIP аналогичен антителам, но их размер меньше, а следовательно, они могут лучше проникать в ткани. SMIP являются одноцепочечными белками, которые содержат одну связывающую область, одну шарнирную область в качестве соединения и один эффекторный домен. Связывающая область содержит модифицированный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), а остальная часть белка может быть построена из Fc (напр., CH2 и CH3 в качестве эффекторного домена) и шарнирной области антитела, такого как IgG1. Генетически модифицированные клетки производят SMIP как антителоподобные димеры, которые примерно на 30% меньше настоящих антител.

[171] Другим примером такого сконструированного миниатюризованного антитела является "**цельное тело**", в котором из молекул IgG4 удалена шарнирная область. Молекулы IgG4 нестабильны и могут обмениваться гетеродимерами легкой-тяжелой

цепей друг с другом. Удаление шарнирной области полностью предотвращает спаривание тяжелой цепи с тяжелой цепью, оставляя только высокоспецифичные моновалентные гетеродимеры легкая/тяжелая цепь, сохраняя при этом Fc область, чтобы обеспечить стабильность и период полураспада *in vivo*.

[172] **Однодоменное антитело (sdAb**, в том числе, но не ограничиваясь ими, **нанотела** Ablynx) представляет собой фрагмент антитела, состоящий из отдельного мономерного переменного домена антитела. Как и целое антитело, он способен селективно связываться со специфическим антигеном, но имеет значительно меньшие размеры благодаря своей молекулярной массе всего 12-15 кДа. В некоторых вариантах реализации однодоменное антитело конструируют из тяжелой цепи антитела (hcIgG). Первое подобное sdAb было разработано на основе hcIgG, обнаруженного у верблюдовых, и названо V_HH-фрагменты. В некоторых вариантах реализации однодоменное антитело конструируют из IgNAR ("иммуноглобулиновый антигенный рецептор", см. ниже) с использованием фрагмента V_{NAR}. Хрящевые рыбы (такие как акулы) имеют подобные антитела IgNAR с тяжелой цепью. В некоторых вариантах реализации sdAb конструируют путем расщепления димерных переменных доменов обычного иммуноглобулина G (IgG), таких как имеющиеся у людей или мышей, на мономеры. В некоторых вариантах реализации нанотело происходит из переменного домена тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации нанотело происходит из переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах реализации sdAb получают путем скрининга библиотек однодоменных последовательностей тяжелой цепи (*напр.*, человеческие однодоменные HC) на предмет обнаружения связывающих антиген-мишень веществ.

[173] Отдельные переменные новые антигенрецепторные доменные фрагменты антител (V_{NAR}, или **V_{NAR} домены**) ведут свое происхождение от иммуноглобулиновых новых антигенрецепторных антител (IgNAR) хрящевых рыб (*напр.*, акул). Будучи одними из самых маленьких известных белковых каркасов на основе иммуноглобулинов, такие однодоменные белки демонстрируют благоприятный размер и загадочные свойства распознавания эпитопа. Зрелые антитела IgNAR состоят из гомодимеров одного переменного нового антигенрецепторного домена (V_{NAR}) и пяти константных новых антигенрецепторных доменов (C_{NAR}). Эта молекула очень стабильна и обладает эффективными характеристиками связывания. Ее внутренняя стабильность, вероятно, может быть связана как с (I) подлежащим каркасом Ig, на котором есть значительное количество заряженных и гидрофильных выставленных на поверхность остатков по сравнению с доменами V_H и V_L обычного антитела, обнаруженных в мышечных

антителах; и (II) со стабилизирующими структурными особенностями в петлях определяющих комплементарность областей (CDR), включая межпетлевые дисульфидные мостики и структуру внутривитальных водородных связей.

[174] **Минитело** является сконструированным фрагментом антитела, содержащим scFv, связанный с доменом CH, таким как CH3 γ 1 (CH3 домен IgG1) или CH4 ϵ (CH4 домен IgE). Например, специфичный по карциноэмбриональному антигену (КЭА) scFv был связан с CH3 γ 1 для создания минитела, которое по ранее известным данным обладало превосходным нацеливанием на опухоль в сочетании с быстрым клиренсом *in vivo* (Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56:3055–3061, 1996). scFv может иметь N-концевой VH или VL. Связью может служить короткий пептид (*напр.*, два аминокислотных линкера, такие как ValGlu), что приводит к нековалентному, бесшарнирному минителу. В качестве альтернативы связью может служить шарнир IgG1 и линкерный пептид GlySer, что приводит к ковалентному шарнирному минителу.

[175] Природные антитела являются моноспецифичными, но бивалентными, поскольку они экспрессируют два идентичных антиген-связывающих домена. В противоположность этому, в некоторых вариантах осуществления, некоторые сконструированные производные антител являются би- или мультиспецифичными молекулами, то есть имеют два или более различных антиген-связывающих домена, каждый с разной целевой специфичностью. Биспецифичные антитела могут быть получены путем слияния двух клеток, продуцирующих антитело, каждая из которых отличается специфичностью. Такие "квадромы" продуцируют несколько видов молекул, поскольку две разные легкие цепи и две разные тяжелые цепи свободно рекомбинируются в квадрамах в нескольких конфигурациях. С тех пор биспецифичные Fab-фрагменты, scFv и полноразмерные mAb создавали с использованием различных технологий (см. выше).

[176] Иммуноглобулиновый белок с двойным переменным доменом (**DVD-Ig**), представляет собой тип IgG с двойной специфичностью, который одновременно нацелен на два антигена/эпитопы (DiGiammarino *et al.*, *Methods Mol Biol.* 899:145-56, 2012). Молекула содержит область Fc и константные области в конфигурации, аналогичной обычному IgG. Однако белок DVD-Ig является уникальным в том, что каждое плечо молекулы содержит два переменных домена (VD). VD внутри плеча связаны в тандеме и могут обладать разными специфичностями связывания.

[177] Можно также создать триспецифичные молекулы-производные антител, Например, путем экспрессии биспецифичных антител с двумя различными Fab и Fc. Примером является мышинное IgG2a антитело против Ep-CAM, крысиное IgG2b антитело против CD3

в квадrome, именуемой ViUII, о котором полагают, что оно делает возможной совместную локализацию опухолевых клеток, экспрессирующих Ep-CAM, Т-клеток, экспрессирующих CD3, и макрофагов, экспрессирующих FC γ RI, таким образом усиливая костимулирующие и противоопухолевые функции иммунных клеток.

[178] **Протела** - полностью рекомбинантные, замаскированные моноклональные антитела, которые остаются инертными в здоровой ткани, но активируются конкретно в микроокружении заболевания (*напр.*, путем протеазного расщепления с помощью протеазы, которой богато микроокружение болезни или которая для него специфична). См. Desnoyers *et al.*, *Sci Transl Med* 5:207ra144, 2013. Подобные методы маскирования могут быть использованы для любого из антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

[179] **Интратело** представляет собой антитело, модифицированное для внутриклеточной локализации, для работы по связыванию внутриклеточного антигена в клетке. Интратело может оставаться в цитоплазме, или может иметь сигнал ядерной локализации, или может иметь последовательность KDEL для ER-нацеливания. Интрателом может быть одноцепочечное антитело (scFv), модифицированные домены VL иммуноглобулинов с гиперустойчивостью, при этом выбранное антитело устойчиво по отношению к более восстанавливающей внутриклеточной среде, или выражено в виде слитого белка с белком, связывающим мальтозу или другими стабильными внутриклеточными белками. Такие оптимизации улучшили стабильность и структуру интрател и могут иметь общую применимость к любому из антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

[180] Антиген-связывающие фрагменты или производные антитела согласно настоящему изобретению могут иметь существенно одинаковые или идентичные (1) области CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи; (2) области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи; или (3) области легкой цепи и/или тяжелой цепи, по сравнению с антителом, из которого они получены/сконструированы. Последовательности в этих областях могут содержать консервативные аминокислотные замены, в том числе замены в пределах областей CDR. В некоторых вариантах осуществления не существует больше, чем 1, 2, 3, 4, или 5 консервативных замен. В качестве альтернативы, антиген-связывающие фрагменты или производные антитела имеют область легкой цепи и/или область тяжелой цепи, которая по меньшей мере около на 90%, 95%, 99% или 100% идентична антителу, из которого они получены/сконструированы. Эти антиген-связывающие фрагменты или производные антител могут иметь существенно такую же

специфичность связывания и/или аффинности к антигену-мишени по сравнению с антителом. В некоторых вариантах реализации значения K_d и/или k_{off} антиген-связывающих фрагментов или производных антител находятся в пределах 10-кратной величины (выше или ниже), 5-кратной величины (выше или ниже), 3-кратной величины (выше или ниже), или 2-кратной величины (выше или ниже) от описанного здесь антитела.

[181] В некоторых вариантах реализации антиген-связывающие фрагменты или производные антител могут быть получены / сконструированы из полностью человеческих антител, гуманизированных антител или химерных антител, и могут быть получены в соответствии с любым известным в данной области методом.

[182] Техники получения моноклональных антител позволяют получать чрезвычайно специфичные связывающиеся с клетками агенты в виде специфичных моноклональных антител. Особенно хорошо известны в данной области техники для создания моноклональных антител, получаемых иммунизацией мышей, крыс, хомяков или любого другого млекопитающего представляющим интерес антигеном, таким как интактные клетки-мишени, антигены, выделенные из клетки-мишени, цельные вирусы, ослабленные цельные вирусы и вирусные белки, такие как белки вирусной оболочки. Могут быть также использованы сенсibilизированные человеческие клетки. Другим методом создания моноклональных антител является использование фаговых библиотек scFv (одноцепочечной вариабельной области), а именно человеческих scFv (см., *напр.*, Griffiths *et al.*, патенты США №. 5885793 и 5969108; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587). Дополнительно могут использоваться антитела с измененной поверхностью, описанные в патенте США № 5639641, как и химерные антитела и гуманизированные антитела.

[183] Связывающийся с клетками агент может быть также пептидом, полученным методом фаг-дисплея (см, *напр.*, Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108(17), 6909-6914) или технологиями пептидных библиотек (см., *напр.*, Dane *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* (2009) 8(5):1312-1318).

[184] В некоторых вариантах реализации СКА согласно изобретению также включает в себя миметик антитела, такой как DARPin, аффитело, аффилин, антикалин, авимер, финомер, пептид с доменом Кунитца, монотело или нанофитин.

[185] Здесь и далее термины "**DARPin**" и "**(спроектированный) белок с анкириновыми повторами**" используются взаимозаменяемо для обозначения

определенных генетически модифицированных белков-миметиков антитела, которые обычно показывают предпочтительное (иногда специфичное) связывание мишени. Целью может быть белок, углеводы или другие химические соединения, и аффинность связывания может быть довольно высокой. DARPIn-ы могут быть получены из природных белков, содержащих анкириновые повторы, и предпочтительно состоят из по меньшей мере трех, как правило, четырех или пяти анкириновых повторяющихся мотивов (обычно около 33 аминокислотных остатков в каждом анкириновом повторяющемся мотиве) этих белков. В некоторых вариантах осуществления DARPIn содержит около четырех или пяти повторов, и может иметь молекулярную массу около 14 или 18 кДа соответственно. Библиотеки белков DARPIn с рандомизированными остатками потенциального взаимодействия с целью, разнообразием свыше 10^{12} вариантов, могут быть сгенерированы на уровне ДНК, для использования при выборе белков DARPIn, которые связываются с желаемой целью (*напр.*, действуя в качестве агонистов или антагонистов рецептора, обратных агонистов, ингибиторов ферментов, или простых связок белка-мишени) с пикомолярной аффинностью и специфичностью, с использованием различных технологий, таких как рибосом-дисплей или фаг-дисплей с частицами распознавания сигнала (ЧРС). См., Например, публикации патентных заявок США № 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146, и 2011/0224100, WO 02/20565 и WO 06/083275 касательно приготовления DARPIn (вся информация которой включена в настоящее описание посредством ссылки), а также C. Zahnd *et al.* (2010) *Cancer Res.*, 70:1595-1605; Zahnd *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, 281(46):35167-35175; и Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:1257-1268 (все включены в настоящее описание посредством ссылки). Также см. публикации патентных заявок США № 2007/0238667; патент США № 7101675; WO 2007/147213; и WO 2007/062466 (вся информация которой включена в настоящее описание посредством ссылки), касательно родственного анкиринподобного повторяющегося белка или синтетического пептида.

[186] Молекулы **аффител** представляют собой небольшие белки, сконструированные для связывания с большим количеством целевых белков или пептидов с высокой аффинностью, таким образом имитируя моноклональные антитела. Аффитело состоит из трех альфа-спиралей, имеет 58 аминокислот и молекулярную массу около 6 кДа. Было показано, что они выдерживают высокие температуры (90 ° C) или кислые и щелочные условиях (pH 2,5 или pH 11), и путем отбора из наивных библиотек были получены связующие вещества с аффинностью ближе к суб-наномолярному диапазону, а также после аффинного созревания были получены связующие вещества с пикомолярной

аффинностью. В некоторых вариантах реализации аффитела сопрягаются со слабыми электрофилами для связывания с целями ковалентно.

[187] **Монотела** (также известны как **аднектины**), являются генетически сконструированными антитело-миметическими белками, способными связываться с антигенами. В некоторых вариантах реализации монотела состоят из 94 аминокислот и имеют молекулярную массу около 10 кДа. Они основаны на структуре человеческого фибронектина, более конкретно на его десятом внеклеточном домене типа III, который имеет структуру, аналогичную структуре вариабельных доменов антител, при этом семь бета-листов образуют ствол и три открытые петли на каждой стороне соответствуют трем гипервариабельным областям. Монотела со специфичностью к различным белкам могут быть адаптированы путем изменения петель BC (между вторым и третьим бета-листом) и FG (между шестым и седьмым листом).

[188] **Тритело** представляет собой самособирающийся миметик антитела, сконструированный на основе С-концевой суперспирализованной области мышинового и человеческого белка хрящевого матрикса (БХМ), который самособирается в параллельный тримерный комплекс. Это очень стабильный тримерный таргетный лиганд, созданный путем слияния специфичного связывающего мишень фрагмента с доменом тримеризации, полученным из БХМ. Полученные в результате слитые белки могут эффективно самособираться в четко определенный параллельный гомотример с высокой стабильностью. Анализ методом поверхностного плазменного резонанса (ППР) тримерных таргетных лигандов продемонстрировали значительно повысившуюся прочность связи с мишенью по сравнению с соответствующими мономерами. Исследования по клеточному связыванию подтвердили, что такие тритела имеют превосходную связывающую силу по отношению к их соответствующим рецепторам.

[189] **Центирин** - еще один антителомиметик, который может быть получен с использованием библиотеки, созданной на основе консенсусной последовательности домена FN3 (Diem *et al.*, *Protein Eng Des Sel.*, 2014). Эта библиотека использует разнообразные позиции в С-нити, CD-петле, F-нити и FG-петле домена FN3, и могут быть выбраны варианты центирин с высокой аффинностью в отношении конкретных целей.

[190] В одном из вариантов реализации связывающийся с клетками агент является антителом против рецептора фолиевой кислоты. Более конкретно, антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизованное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который специфически связывает человеческий рецептор фолата 1 (известный также как фолатный рецептор альфа (FR- α)). Термины

"человеческий рецептор фолата 1", "FOLR1" или " фолатный рецептор альфа (FR-α)" здесь и далее относится к любому нативному человеческому FOLR1, если не указано иное. Таким образом, все эти термины могут относиться либо к белку либо к последовательности нуклеиновой кислоты, как указано в данном описании. Термин "FOLR1" охватывает "полноразмерный", необработанный FOLR1, а также любую форму FOLR1, которая является результатом обработки внутри клетки. Антитело против FOLR1 содержит: (а) CDR1 тяжелой цепи , включающий GYFMN (SEQ ID NO:1); CDR2 тяжелой цепи , включающий RHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO:2) и CDR3 тяжелой цепи , включающий YDGSRAMDY (SEQ ID NO:3); и б) CDR1 легкой цепи, включающий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:4); CDR2 легкой цепи, включающий RASNLEA (SEQ ID NO:5) и CDR3 легкой цепи, включающий QQSREYPYT (SEQ ID NO:6); при этом Xaa₁ выбран из K, Q, H, и R; Xaa₂ выбран из Q, H, N, и R; и Xaa₃ выбран из G, E, T, S, A, и V. Предпочтительно последовательность CDR2 тяжелой цепи содержит RHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

[191] В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и включающие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFT**GYFMN**NWKQSPGQSLEWIGRI**RHPYDGDTFYNQKFQ**QKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCT**RYDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

[192] В другом варианте реализации изобретения антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый ДНК плазмиды, депонированной в АТСС 7 апреля 2010 года и имеющей депозитные номера АТСС РТА-10772 и РТА-10773 или 10774.

[193] В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и включающие легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность

DIVLTQSPKSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVDP
 RFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); или
 DIVLTQSPKSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVDP
 RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

[194] В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и включающие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. Предпочтительно антитело содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

[195] В другом варианте реализации изобретения антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, кодируемый ДНК плазмиды, депонированной в АТСС 7 апреля 2010 года и имеющей депозитные номера АТСС РТА-10772 и РТА-10773 или 10774.

[196] В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и содержит переменный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере около на 90%, 95%, 99% или 100% идентичен QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFYGFYFNWVKQSPGQSLWIGRIHPYDGDFTFYNQKF QGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11), и переменный домен легкой цепи, который по меньшей мере около на 90%, 95%, 99% или 100% идентичен DIVLTQSPKSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVDP RFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12); или DIVLTQSPKSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHWHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVDP RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

[197] В другом варианте реализации изобретения антитело против фолатного рецептора является huMov19 или M9346A (см, напр., патент США № 8709432, патент США № 8557966, и WO2011106528, все из которых включены в настоящее описание посредством ссылки).

[198] В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент является антителом против EGFR или фрагментом такого антитела. В одном варианте осуществления антитело против EGFR является неантагонистическим антителом, включая, например, описанные в WO2012058592 антитела, включенные в настоящее описание посредством ссылки. В другом варианте реализации антитело против EGFR является нефункциональным антителом, например, гуманизированным ML66 или EGFR-8. Более конкретно антитело против EGFR является huML66.

[199] В еще одном варианте реализации антитело против EGFR содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Здесь и далее подчеркнутые двойной линией последовательности представляют собой переменные области (*m.e.* переменной области тяжелой цепи или HCVR, и переменной области легкой цепи или LCVR) последовательностей тяжелой или легкой цепи, в то время как выделенные жирным последовательности представляют собой CDR-области (*m.e.* CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, от N-конца к C-концу последовательностей тяжелой или легкой цепи).

Антитело	Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой/легкой цепи
huML66HC	<p><u>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPGKGLEWMGVIWNHG</u></p> <p><u>GTDYNPSIKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVRKGGIYFDYWGQGV</u></p> <p><u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u></p> <p>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</p> <p>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</p> <p>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</p> <p>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</p> <p>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLS</p> <p>PG (SEQ ID NO:14)</p>
huML66LC	<p><u>DTVLTQSPSLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWYQOKPGQOPKLLIYLASHRESG</u></p>

	<u>VPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYCQQSRNDPWTFGQGTKLELKRTVAA</u> PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)
--	---

[200] В еще одном варианте реализации антитело против EGFR содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 14, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 15, и предпочтительно специфически связывается с EGFR.

[201] В еще одном варианте реализации антитело против EGFR содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 14, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15, и предпочтительно специфически связывается с EGFR.

[202] В другом варианте реализации изобретения антитела против EGFR представляют собой антитела, описанные в 8790649 и WO 2012/058588, которые включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации антитело против EGFR является антителом huEGFR-7R.

[203] В одном из вариантов реализации антитело против EGFR включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTF~~T~~SYWMQWVKORPGGLECIG~~T~~IYPGDGDTT~~T~~YTOKE QGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARYDAPGYAMDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO:16) и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDINNYLAWYQHKGKGP~~K~~LLIH~~T~~STLHPGIPSRFSG SGSGRDYSFSSISLEPEDIA~~T~~YYCLQYD~~N~~LLYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17), или область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINNYLAWYQHKGKGPKLLIHYTSTLHPGIPSRFSG
SGSGRDYSFSSISLEPEDIATYYCLOYDNLLYTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18).

[204] В другом из вариантов реализации антитело против EGFR включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность изложенную в SEQ ID NO:17.

[205] В другом из вариантов реализации антитело против EGFR включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность изложенную в SEQ ID NO:18.

[206] В еще одном варианте реализации антитело против EGFR содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 16, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 17 или 18, и предпочтительно специфически связывается с EGFR.

[207] В еще одном варианте реализации антитело против EGFR содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентичную SEQ ID NO: 16, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 17 или 18, и предпочтительно специфически связывается с EGFR.

[208] В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитела против CD19, такие как те, которые описаны в патенте США № 8435528 и WO2004 / 103272, включены посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления антитело против CD19 включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную

последовательность
 QVQLVQPGAEEVVKPGASVKLSCKTSGYTFT**SNWMH**WVKQAPGGLEWIG**EIDPSDSY**TNQN**F**
 QGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARG**SNPYYYAMDY**WGQGTSVTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD**TLMI**
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK (SEQ ID NO:19)и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPA~~IMS~~ASPGERVTMTCS**ASSGVNYMHWY**QOKPGTSPRRWIY**DTSK**LASGVPARFSGS
 GSGTDYSLT~~ISSME~~PEDAATYY**CHQ****RG**SYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20).

[209] В другом варианте реализации изобретения антитело против CD19 представляет собой антитело huB4.

[210] В еще одном варианте реализации антитело против CD19 содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 19, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 20, и предпочтительно специфически связывается с CD19.

[211] В еще одном варианте реализации антитело против CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 19, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 20, и предпочтительно специфически связывается с CD19.

[212] В еще одном варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитела против Muc1, такие как те, которые описаны в патенте США № 7834155, WO 2005/009369 и WO 2007/024222, включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации антитело против Muc1 включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGQGLEWIGYIYPGN**GATNYNQKF**
QGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARG**DSVPFAY**WGQGLTTLTVSAASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:21) и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVTITCS**SAHSSVSEFMH**WFQOKPGTSPKLWII**STSS**LASGVPARF**GG**S
GSGTSYSLT~~ISSME~~AEDAATYY**CQ****OR**SS**FPLT**FGAGTKLEL**KRT**VAAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA

CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22).

[213] В другом варианте реализации антитело против Muc1 представляет собой антитело huDS6.

[214] В еще одном варианте реализации антитело против Muc1 содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 21, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 22, и предпочтительно специфически связывается с Muc1.

[215] В еще одном варианте реализации антитело против Muc1 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 21, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 22, и предпочтительно специфически связывается с Muc1.

[216] В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитело против CD33 или его фрагмент, такие как те, которые описаны в патенте США № 7557189, 7342110, 8119787 и 8337855 и WO2004 / 043344, которые включены посредством ссылки. В другом варианте реализации изобретения антитело против CD33 представляет собой антитело huMy9-6.

[217] В одном из вариантов реализации антитело против CD33 включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKOTPGQGLEWVGVIIYPGNDDISYNQKF
QGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQTTVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
 (SEQ ID NO:23), и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность E
EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWYQQIIPGQSPRLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSRTEFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24).

[218] В еще одном варианте реализации антитело против CD33 содержит CDR1-CDR3

тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 23, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 24, и предпочтительно специфически связывается с CD33.

[219] В еще одном варианте реализации антитело против CD33 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентичную SEQ ID NO: 23, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 24, и предпочтительно специфически связывается с CD33.

[220] В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитело против CD37 или его фрагмент, такие как те, которые описаны в патенте США № 8765917 и WO 2011/112978, которые включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации изобретения антитело против CD37 представляет собой антитело huCD37-3.

[221] В одном из вариантов реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQOKPGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLOPEDFGTYYCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25) и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKKDHKSQVFLKLNLSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26), или область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSSLKSRLSIKKDHKSQVFLKLNLSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:27)

[222] В другом из вариантов реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность изложенную в SEQ ID NO:26.

[223] В еще одном из вариантов реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:25, и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность изложенную в SEQ ID NO:27.

[224] В еще одном варианте реализации антитело против CD37 содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 26 или 27, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 25, и предпочтительно специфически связывается с CD37.

[225] В еще одном варианте реализации антитело против CD37 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентичную SEQ ID NO: 26 или 27, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 25, и предпочтительно специфически связывается с CD37.

[226] В еще одном варианте реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность EIVLTQSPATMSASPGERVTMTCSATSSVTYMHWYQOKPGQSPKRWIYDTSNLPYGVPARFSGS
GSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQOWSDNPPTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28) и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

OVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVSGYSITSGFAHWIRQHPGNKLEWMGYILYSGSTVYSPSL
KSRISITRDTSKNHFFLQLNSVTAADTATYYCARGYGYGAWFAYWGQGLTVTVAASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G (SEQ ID NO:29).

[227] В еще одном варианте реализации антитело против CD37 содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 29, и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO: 28, и предпочтительно специфически связывается с CD37.

[228] В еще одном варианте реализации антитело против CD37 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) по меньшей мере околона 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентичную SEQ ID NO: 29, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) по меньшей мере около на 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 28, и предпочтительно специфически связывается с CD37.

[229] В еще одном из вариантов реализации изобретения антитело против CD37 представляет собой антитело huCD37-50.

КОНЬЮГАТЫ "СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С КЛЕТКАМИ АГЕНТ - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"

[230] Настоящее изобретение также обеспечивает конъюгаты "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство", содержащие связывающийся с клетками агент, присоединенное к одному или более цитотоксическим соединениям согласно настоящему изобретению с помощью различных линкеров, включая, но не ограничиваясь ими, дисульфидные линкеры, тиоэфирные линкеры, амидносвязанные линкеры, кислотно-лабильные линкеры, пептидазо-лабильные линкеры и эстеразо-лабильные линкеры.

[231] Во втором варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает конъюгат, включающий: цитотоксическое соединение и связывающийся с клетками агент (СКА), где цитотоксическое соединение ковалентно связано с СКА, и где цитотоксическое соединение описано структурными формулами (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') или (VI'), в которых переменные имеют значения, указанные выше.

[232] В некоторых вариантах реализации цитотоксическое соединение представлено структурной формулой (I') или ее фармацевтически приемлемой солью.

[233] В некоторых вариантах реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') один из L', L'' и L''' представлен формулой (A'),

$-Z_1-P-Z_2-R_x-J'$ (A'),

а другие представляют собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, галоген, -OH, (C₁-C₆)алкокси, или -NO₂. Более конкретно один из L', L'' и L''' представлен формулой (A'), а другие представляют собой -H.

[234] В первом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') L' представлен формулой (A'), а L'' и L''' представляют собой -H, а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации.

[235] Во втором конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') R_x представляет собой линейный, разветвленный или циклический алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C₁-C₃)алкилом, (C₁-C₃)алкоксигруппой, гало(C₁-C₃)алкилом, заряженным заместителем или ионизируемой группой Q; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или для первого конкретного варианта реализации.

[236] В некоторых вариантах реализации Q представляет собой I) -SO₃H, -Z'-SO₃H, -OPO₃H₂, -Z'-OPO₃H₂, -PO₃H₂, -Z'-PO₃H₂, -CO₂H, -Z'-CO₂H, -NR₁₁R₁₂, или -Z'-NR₁₁R₁₂, или их фармацевтически приемлемую соль; либо II) -N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻ или -Z'-N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R₁₄ - R₁₆ каждый независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; и X⁻ представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для второго конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой -SO₃H или его фармацевтически приемлемую соль.

[237] В третьем конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') J содержит фрагмент, ковалентно связанный с СКА и являющийся -NR^{cl} или -C(=O)-, где R^{cl} представляет собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 4 атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH или (C₁-C₃)алкокси; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации, первого конкретного варианта реализации или второго конкретного варианта реализации.

[238] В некоторых вариантах реализации J' представляет собой -C(=O)-; а остальные переменные являются такими, как описано выше в третьем конкретном варианте реализации.

[239] В четвертом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') L' описан следующей формулой:



где:

J' представляет собой $-\text{C(=O)-}$;

R_a и R_b, при каждом появлении, каждый независимо представляет собой $-\text{H}$, (C₁-C₃)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

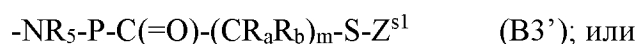
m равен целому числу от 1 до 6;

m' равен 0 или целому числу от 1 до 6; и

Sy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, $-\text{OH}$, (C₁-C₃)алкилом, (C₁-C₃)алкоксигруппой или гало(C₁-C₃)алкилом; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго или третьего конкретного варианта реализации.

[240] В некоторых вариантах реализации R_a и R_b оба представляют собой H; Sy для формул (B2') и (C2') представляет собой циклогексан; и R₅ представляет собой H или Me; а другие переменные такие же, как описано выше для четвертого конкретного варианта реализации. Более конкретно m' в формулах (B2') и (C2') равен 0 или 1.

[241] В пятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') L' представлен следующей формулой:

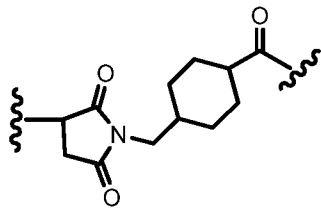


где:

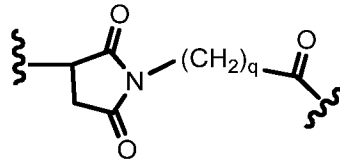
R_a и R_b, при каждом появлении, каждый независимо представляет собой $-\text{H}$, (C₁-C₃)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

m равен целому числу от 1 до 6;

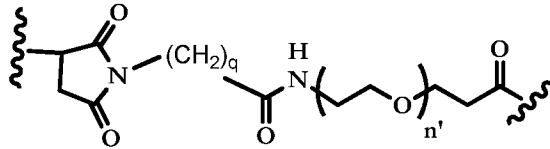
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:



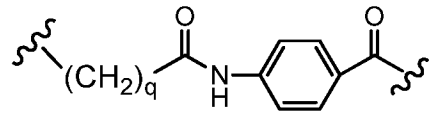
(b1);



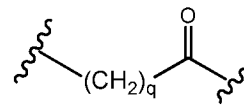
(b2);



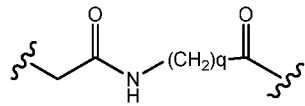
(b3);



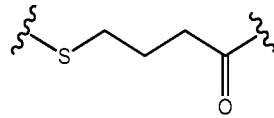
(b4);



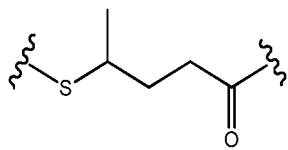
(b5);



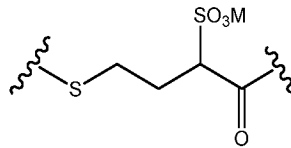
(b6);



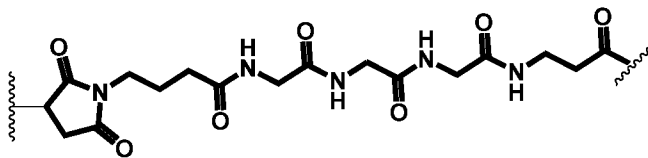
(b7);



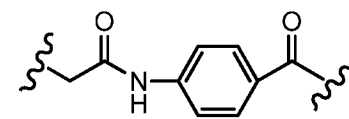
(b8);



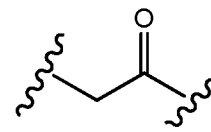
(b9);



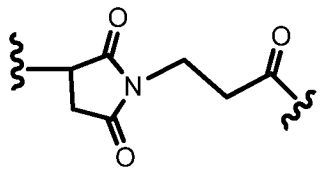
(b10);



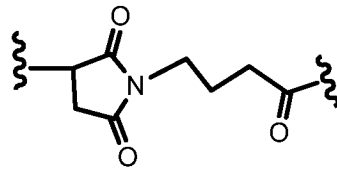
(b11);



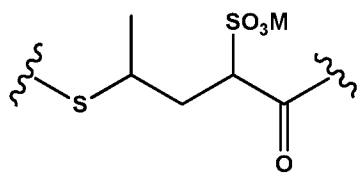
(b12);



(b13);



(b14); i



(b15);

где:

q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой –H или SO_3M ;

M представляет собой фармацевтически приемлемый катион (*напр.*, H^+ , Na^+ или K^+); другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта осуществления или первого, второго, третьего, четвертого конкретного варианта реализации.

[242] В некоторых вариантах реализации заряженный заместитель или ионизируемая группа Q представляет собой I) $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{Z}'-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{Z}'-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$, или $-\text{Z}'-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$, или их фармацевтически приемлемой солью; либо II) $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ или $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14} - R_{16} каждый независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; и X⁻ представляет собой фармацевтически приемлемым анионом; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой $-\text{SO}_3\text{H}$ или его фармацевтически приемлемую соль.

[243] В некоторых вариантах реализации R_a и R_b оба представляют собой –H и R_5 представляет собой H или Me; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

[244] В некоторых вариантах реализации $-(\text{CR}_a\text{R}_b)_m-$ представляет собой $-(\text{CH}_2)_m-$, $\text{C}(\text{Me}_2)-$ и m равен целому числу от 1 до 5; другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

[245] В шестом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 10 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого или пятого конкретного варианта реализации.

[246] В некоторых вариантах реализации P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[247] В некоторых вариантах реализации P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-

Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β -Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[248] В некоторых вариантах реализации Р представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala и D-Ala-D-Ala; другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

[249] В седьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') двойная линия == между N и C представляет двойную связь; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого или шестого конкретного варианта реализации.

[250] В восьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') двойная линия == между N и C представляет двойную связь, X представляет собой -H или аминокзащитную группу; и Y выбран из -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," необязательно замещенного 5-6-членного азотсодержащего гетероцикла, -SO₃H, -SO₂H и OSO₃H; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого конкретного варианта реализации.

[251] В некоторых вариантах реализации, Y выбран из -H, -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt или -NHON, где M представляет собой -H, Na⁺ или K⁺; другие переменные такие же, как описано выше для седьмого конкретного варианта реализации. Более конкретно Y представляет собой -H, -SO₃M или -OH.

[252] В девятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') X' выбран из группы, состоящей из -H, -OH, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, и фенила; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого или восьмого конкретного варианта реализации.

[253] В некоторых вариантах реализации X' представляет собой -H, -OH, (C₁-C₃)алкил, гало(C₁-C₃)алкил или фенил; другие переменные такие же, как описано выше для девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно X' представляет собой -H, -OH или -Me. Еще более конкретно X' представляет собой -H.

[254] В десятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI') Y' представляет собой -Н, оксогруппу, (C₁-C₃)алкил или гало(C₁-C₃)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого или девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно Y' представляет собой -Н или оксогруппу. Еще более конкретно Y' представляет собой Н.

[255] В одиннадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI'), А и А' являются одинаковыми или разными и выбраны из -О-, -S-, -NR₅- и оксогруппы (C=O)-; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого конкретного варианта реализации. Более конкретно А и А' являются одинаковыми или разными и выбраны из -О- или -S- Еще более конкретно А и А' представляют собой -О-.

[256] В двенадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI'), R₆ представляет собой -ОМе; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или одиннадцатого конкретного варианта реализации.

[257] В тринадцатом конкретном варианте осуществления для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI'), R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' и R₄' представляют собой независимо -Н, галоген, -NO₂, -ОН, (C₁-C₃)алкил, гало(C₁-C₃)алкил или (C₁-C₃)алкоксигруппу; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого или двенадцатого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' и R₄' все представляют собой -Н.

[258] В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI'), R, R', R'' и R₅ каждый независимо представляет собой -Н или (C₁-C₃)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого конкретного варианта реализации.

[259] В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') и (VI'), двойная линия == между N и C символизирует одинарную

связь или двойную связь, при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой -H, а если это одинарная связь, то X представляет собой -H, Y представляет собой -OH или -SO₃M;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁' , R₂' , R₃' и R₄' все представляют собой -H;

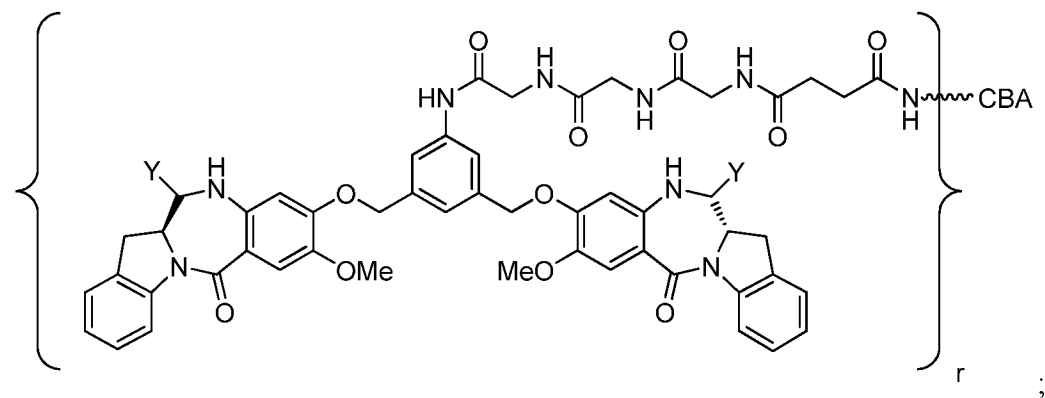
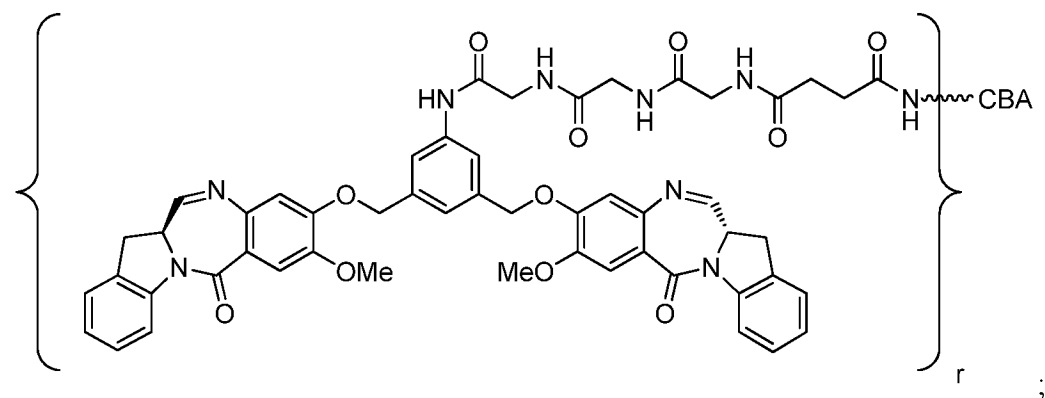
R₆ представляет собой -OMe;

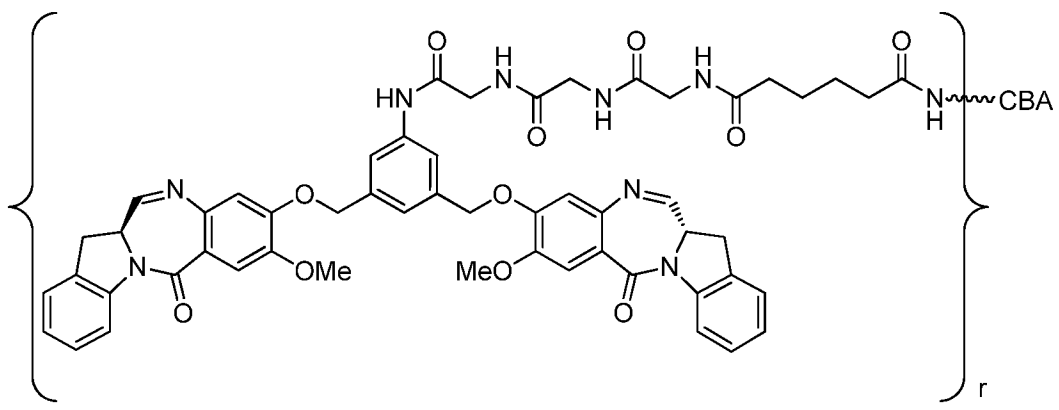
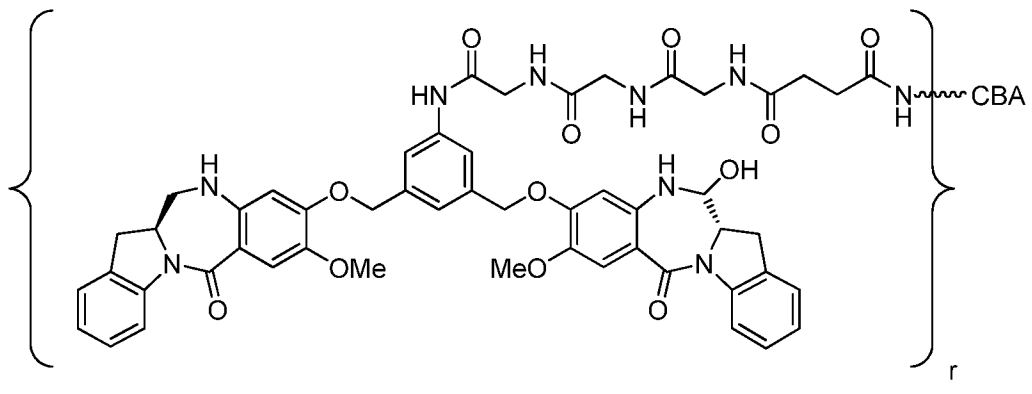
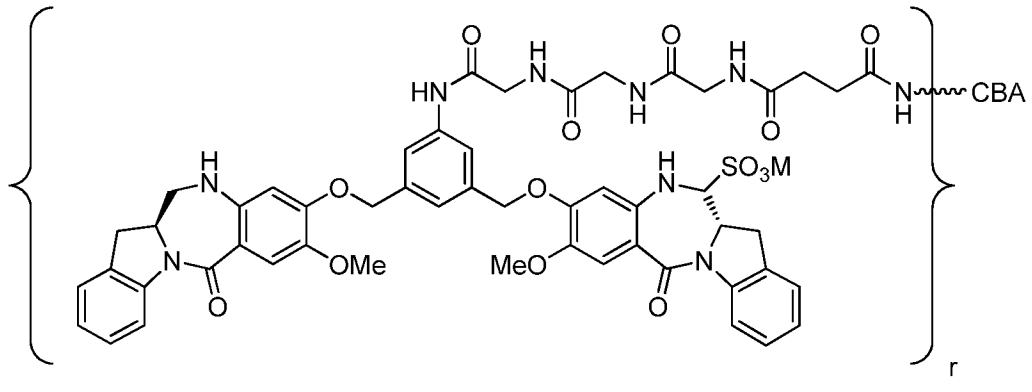
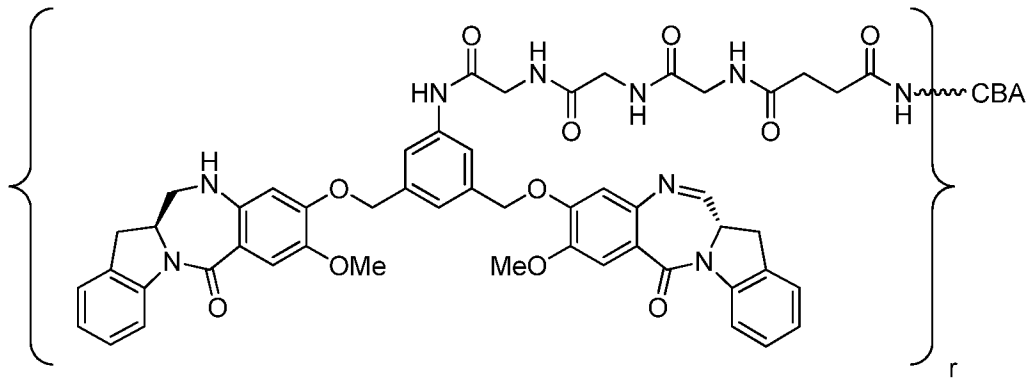
X' и Y' оба представляют собой -H;

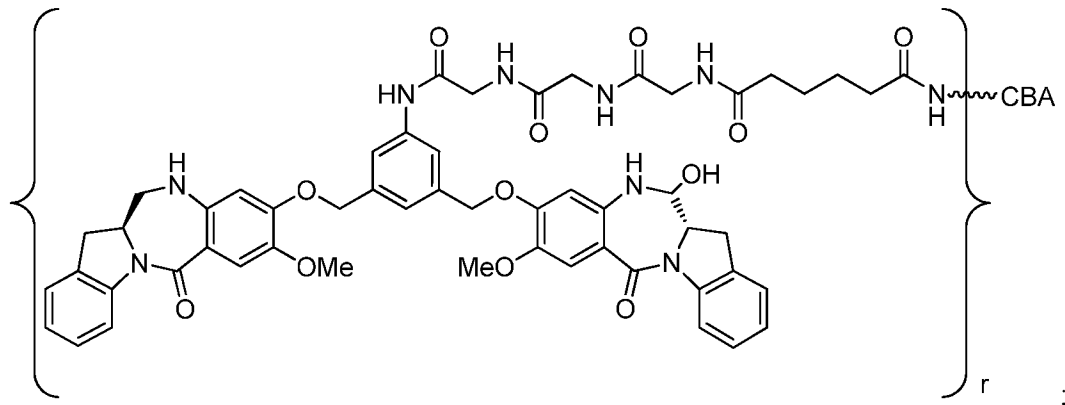
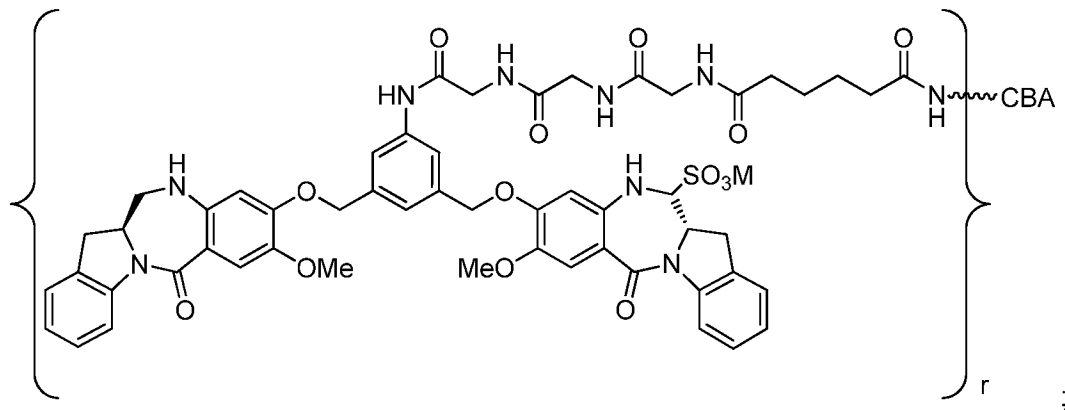
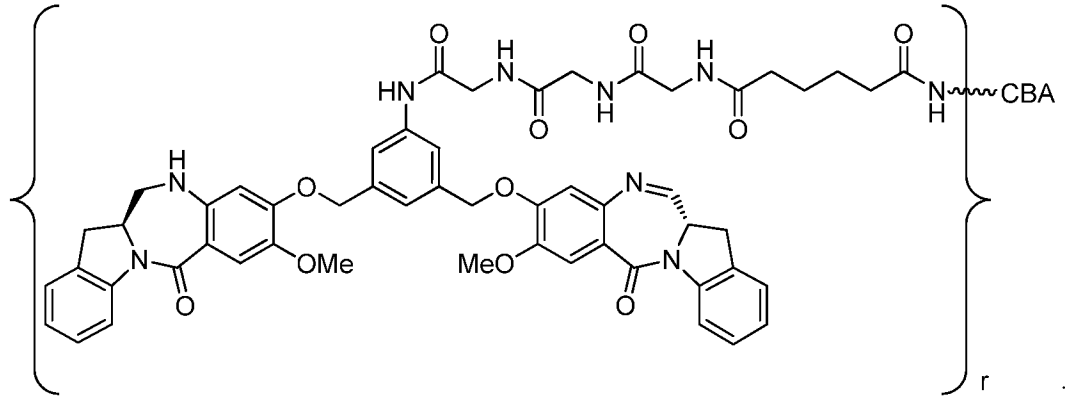
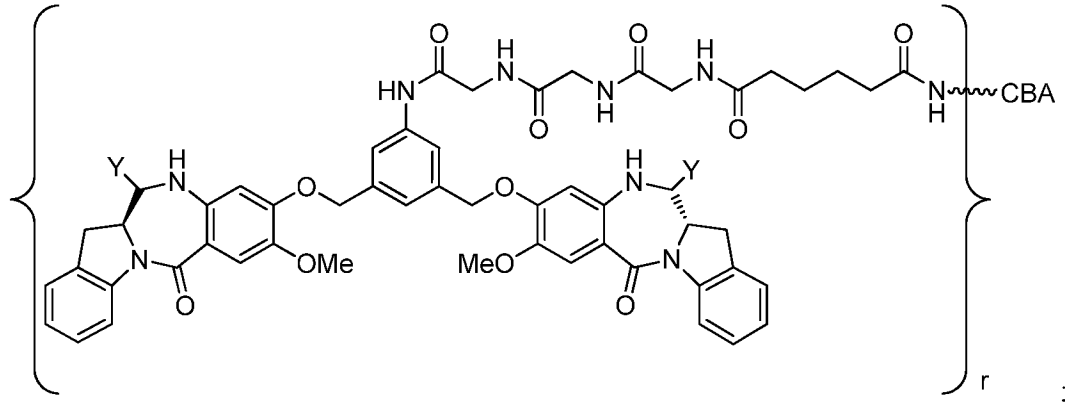
A и A' представляют собой -O-;

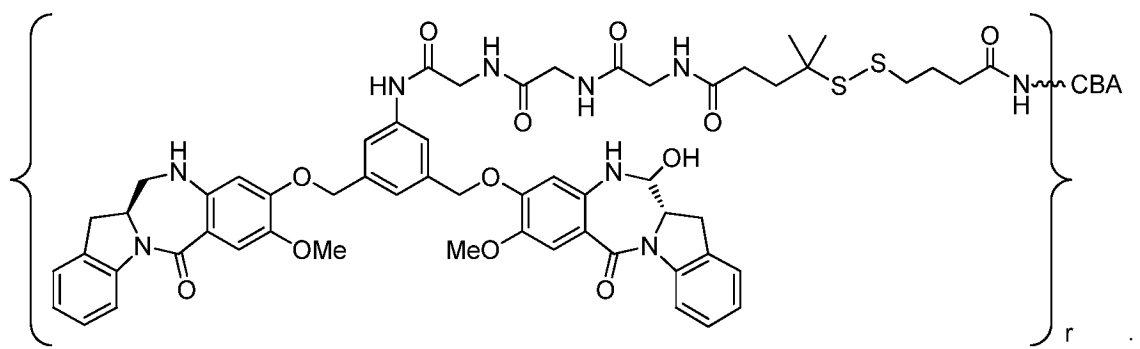
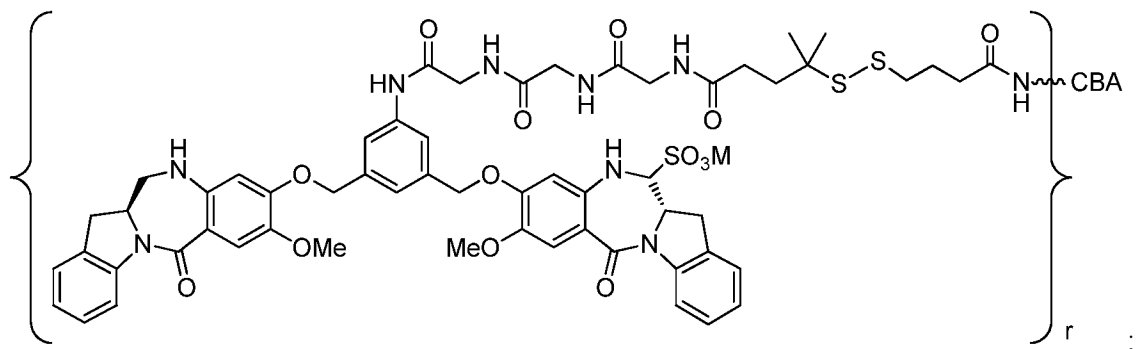
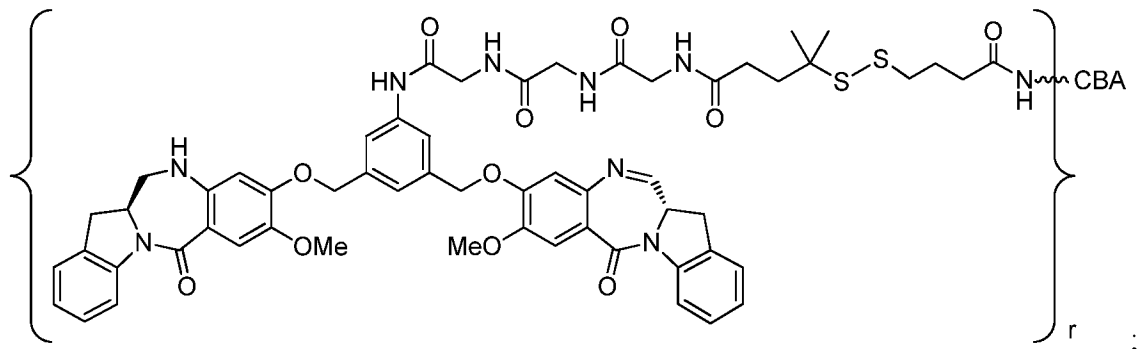
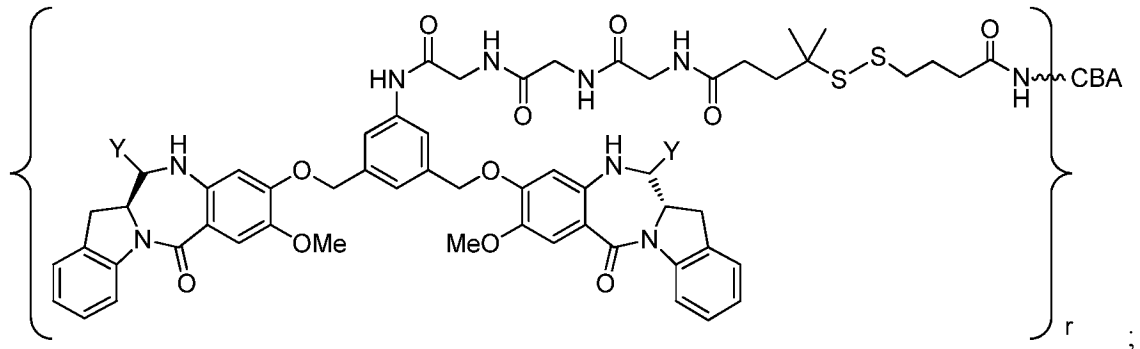
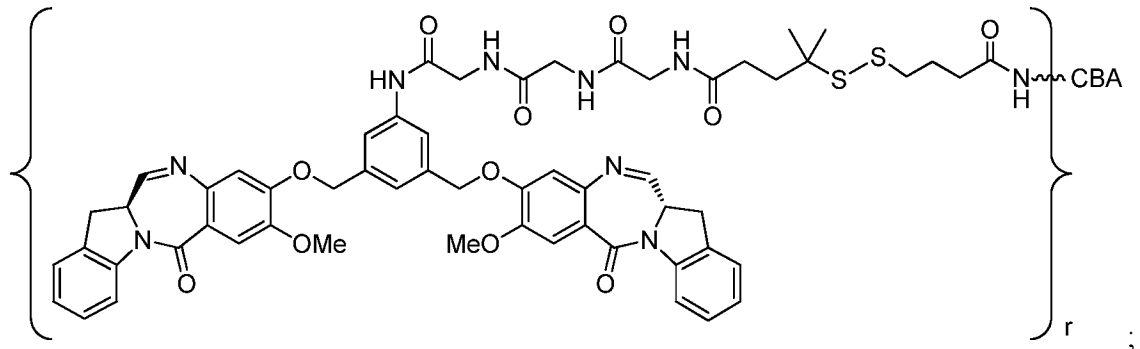
M представляет собой H, Na⁺ или K⁺; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого конкретного варианта реализации.

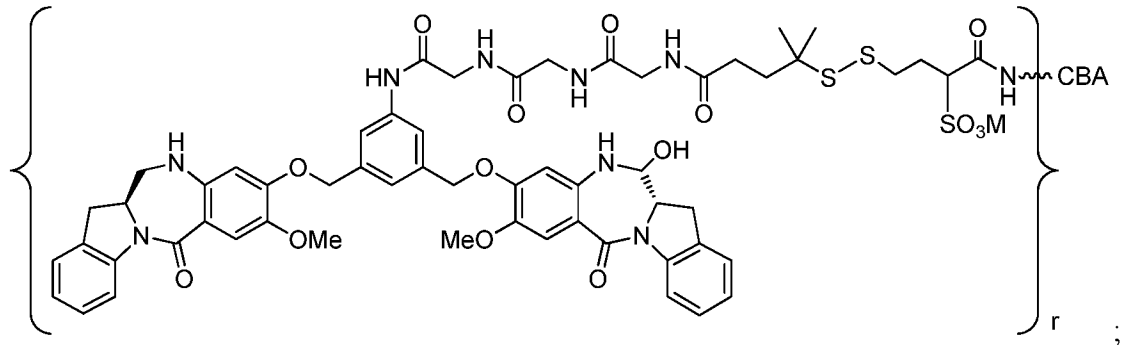
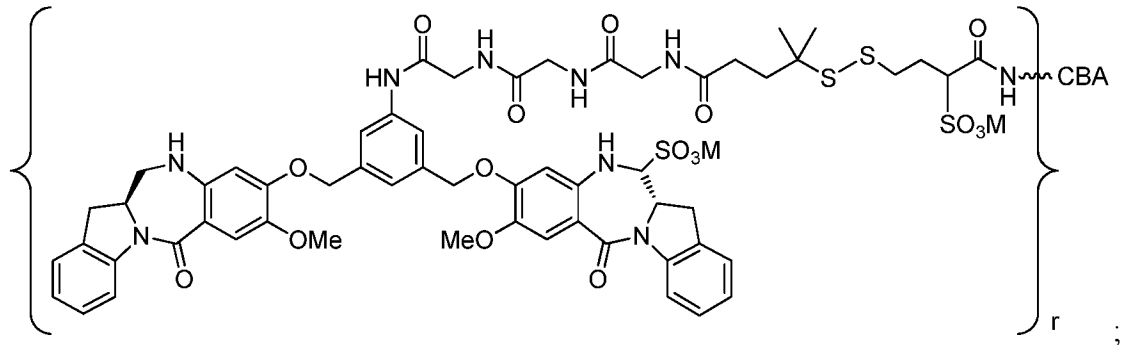
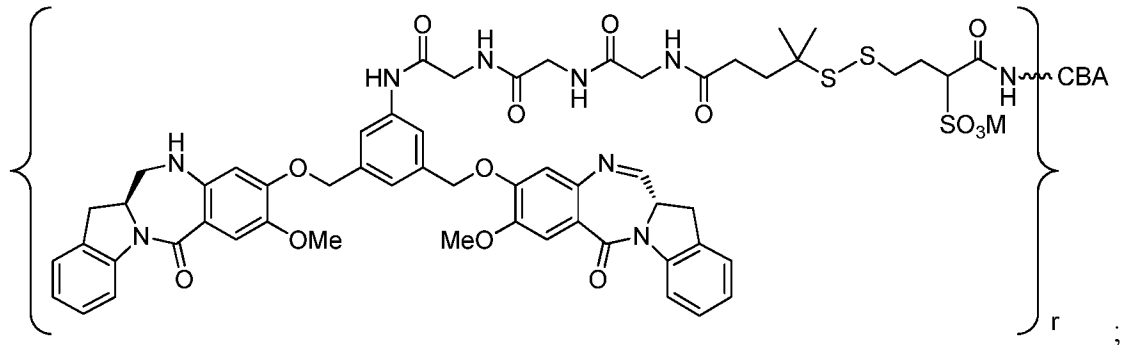
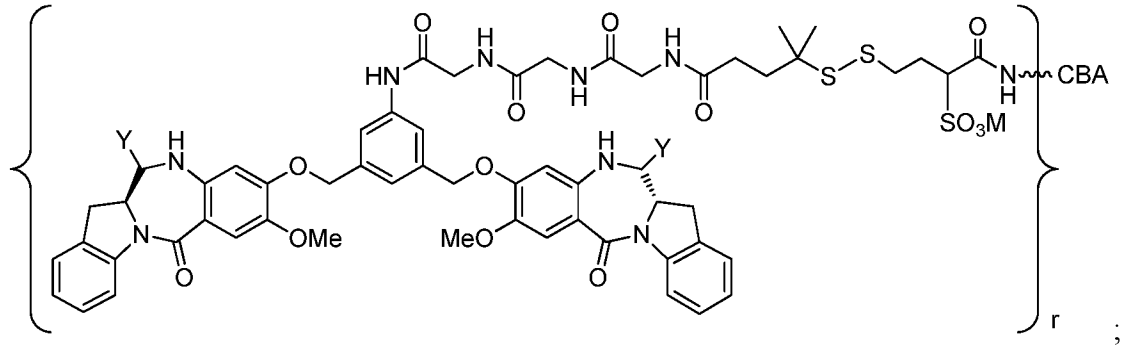
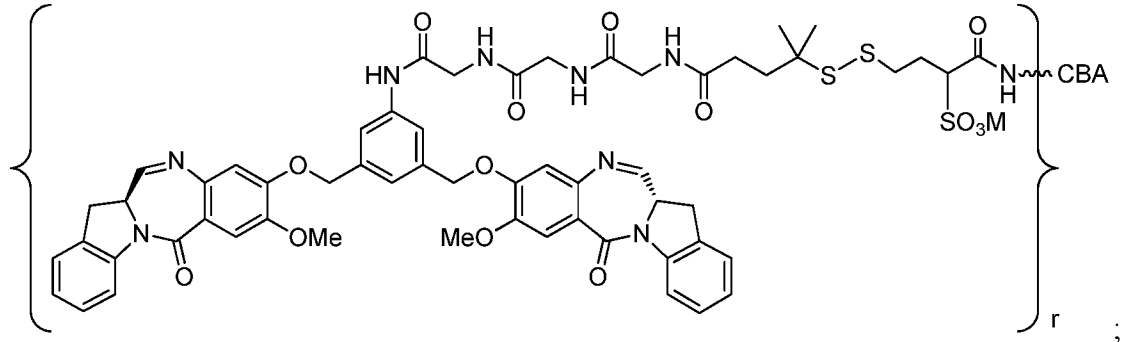
[260] В пятнадцатом конкретном варианте реализации конъюгат согласно настоящему изобретению представлен любой из нижеследующих структурных формул:

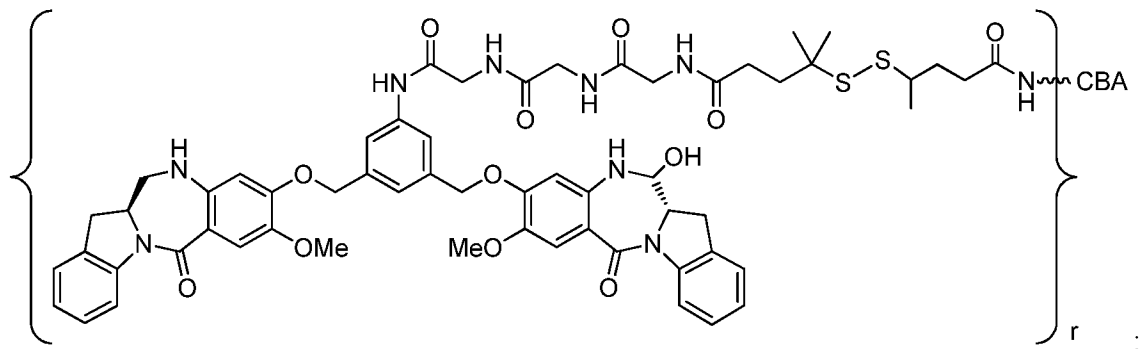
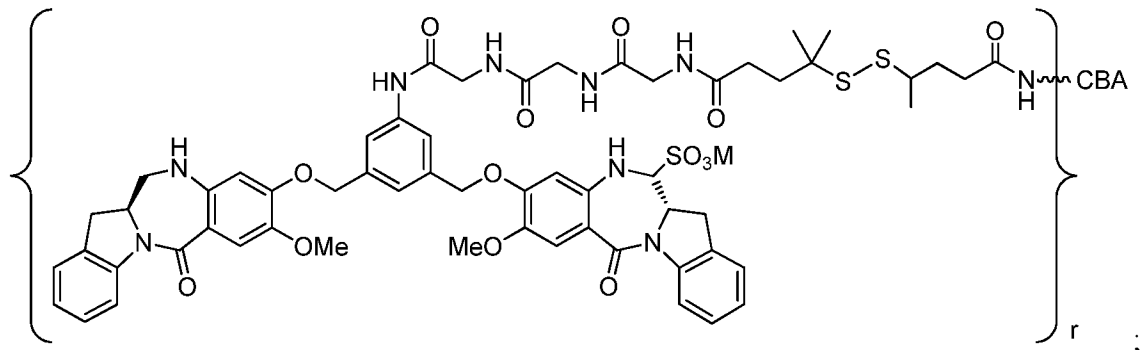
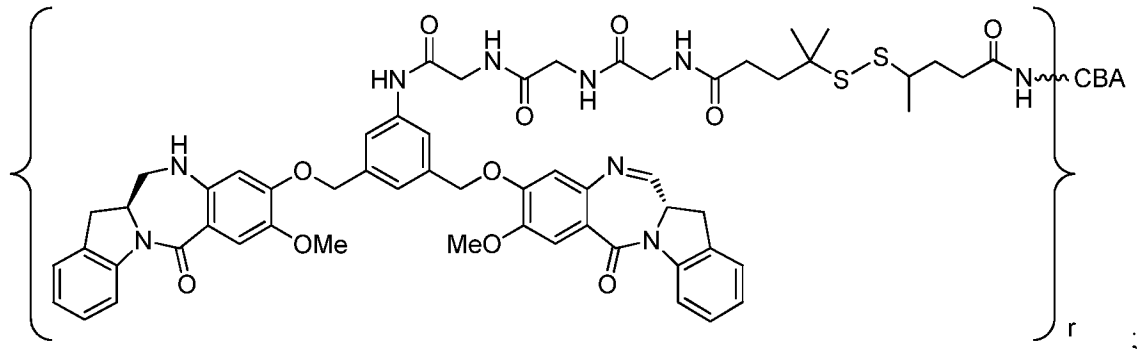
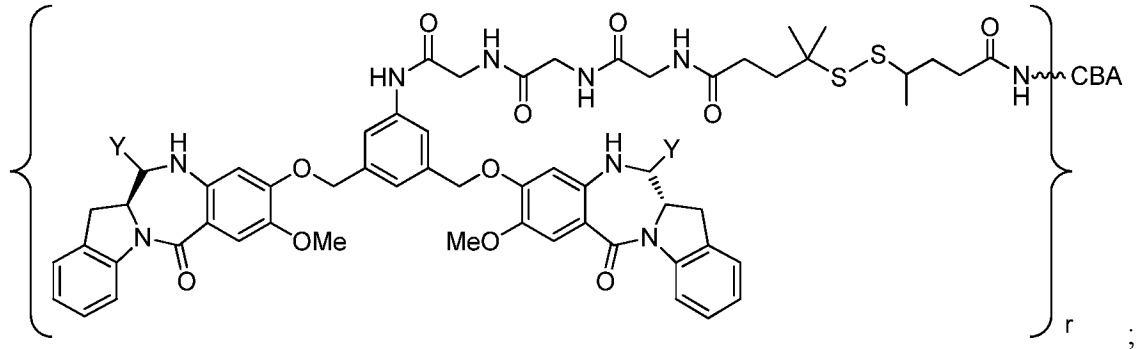
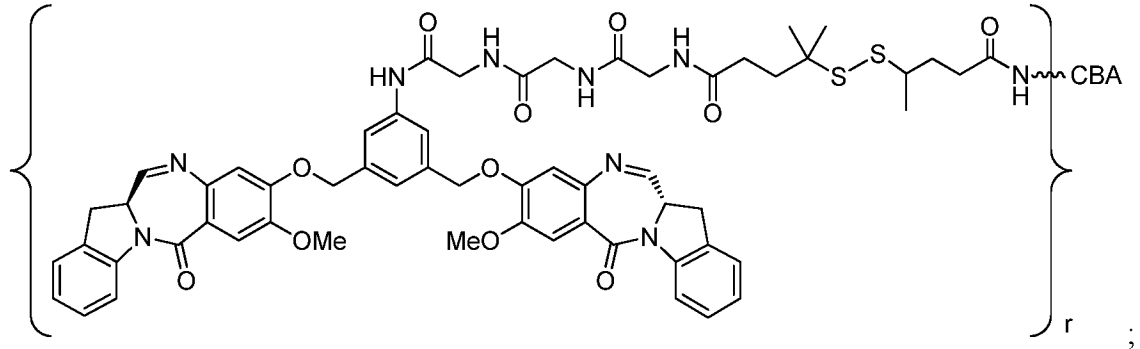


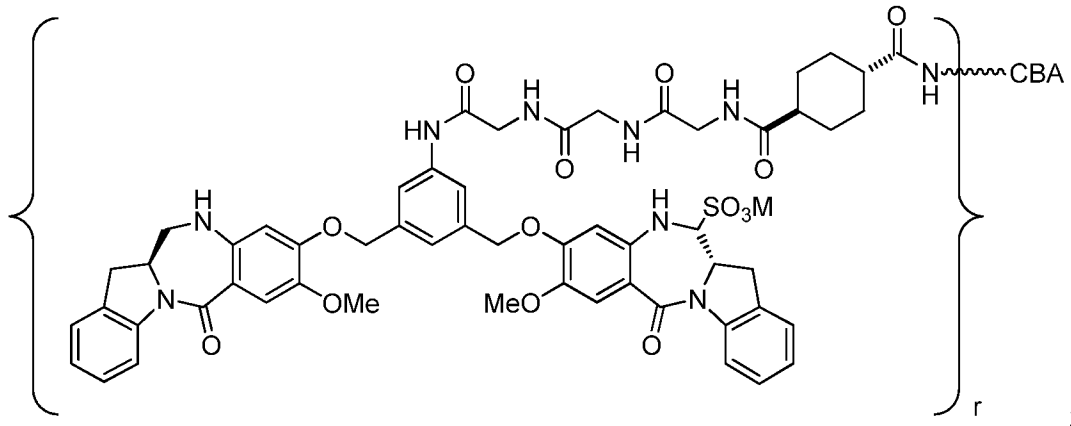
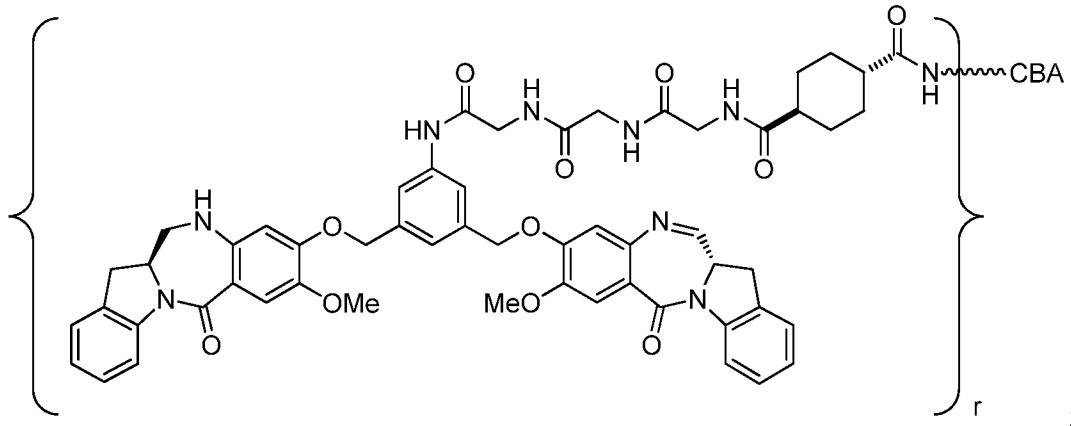
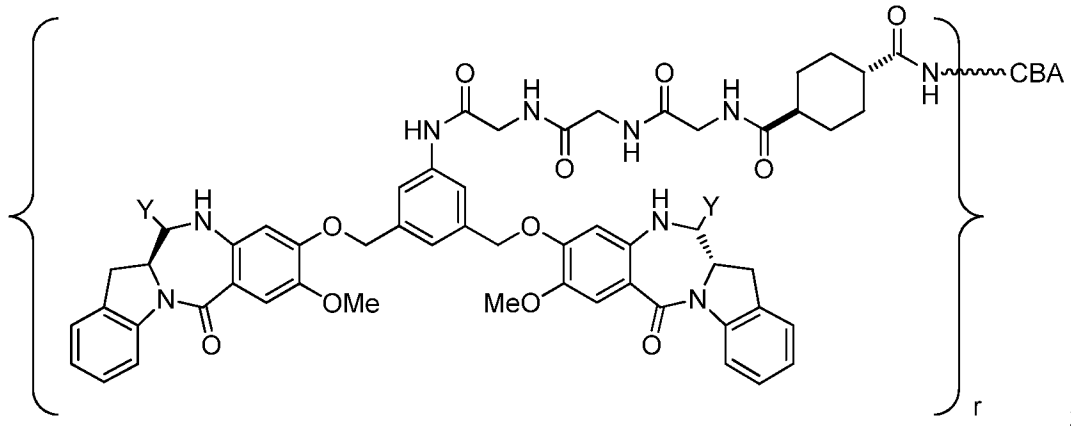
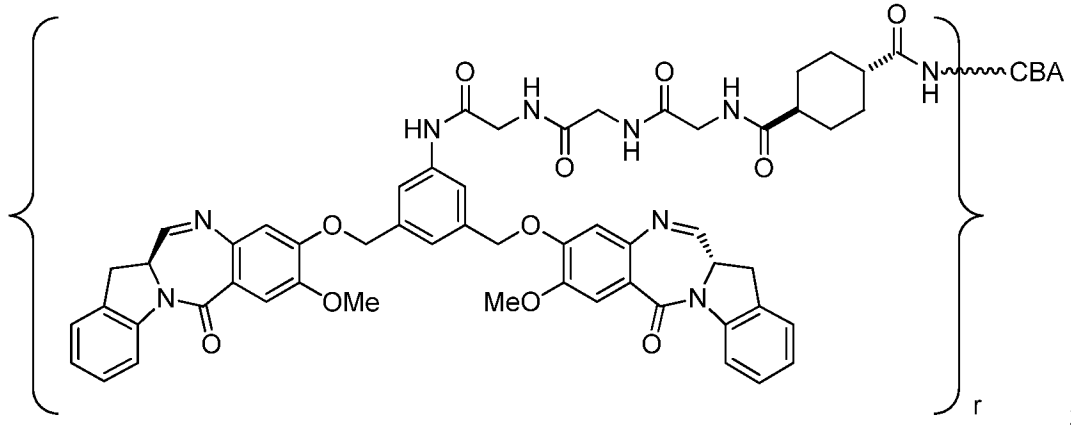


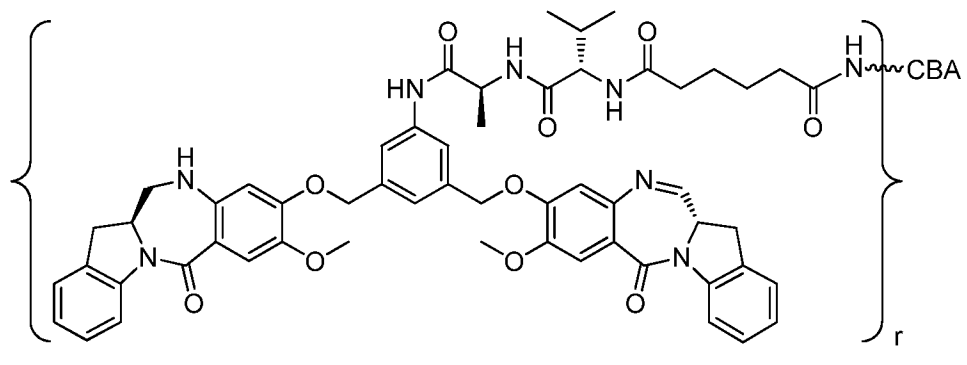
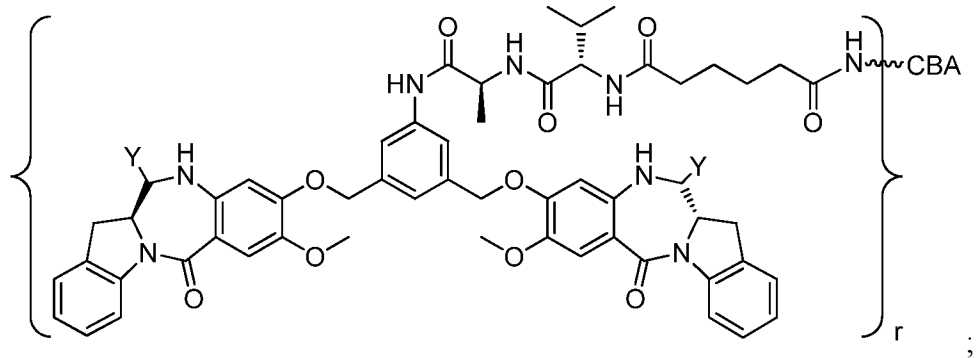
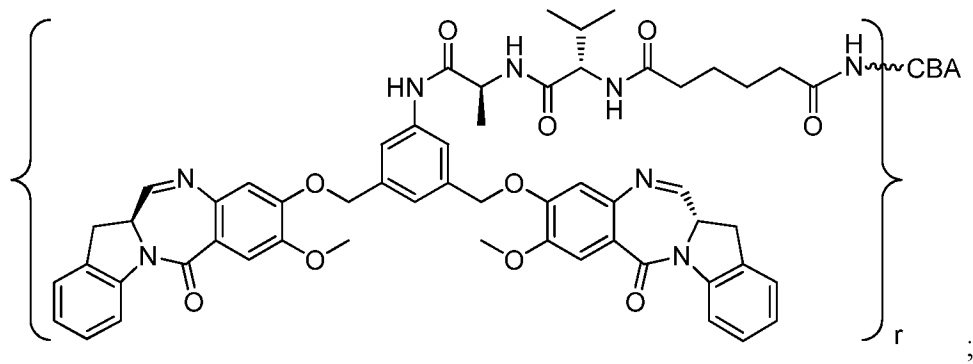
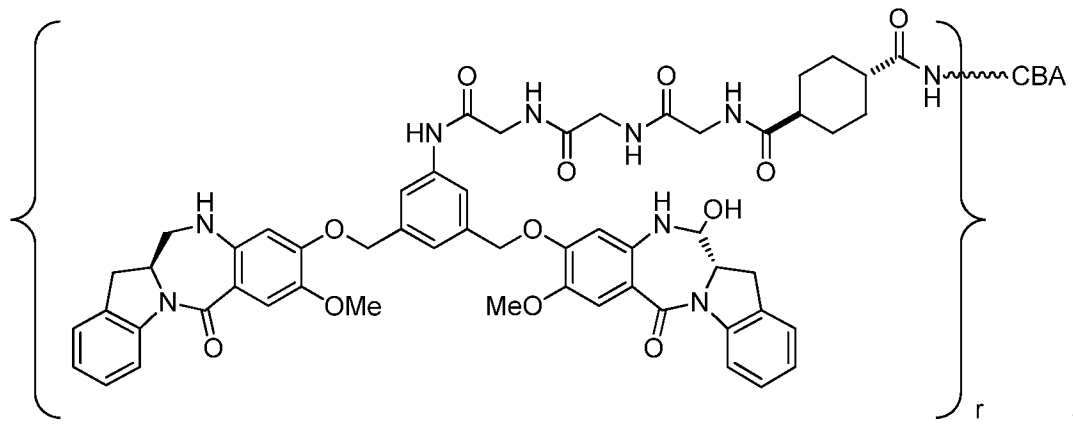


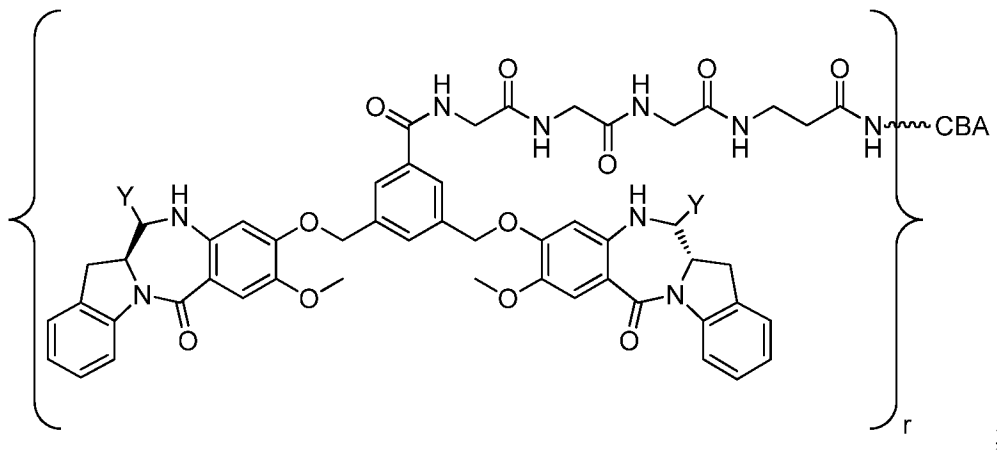
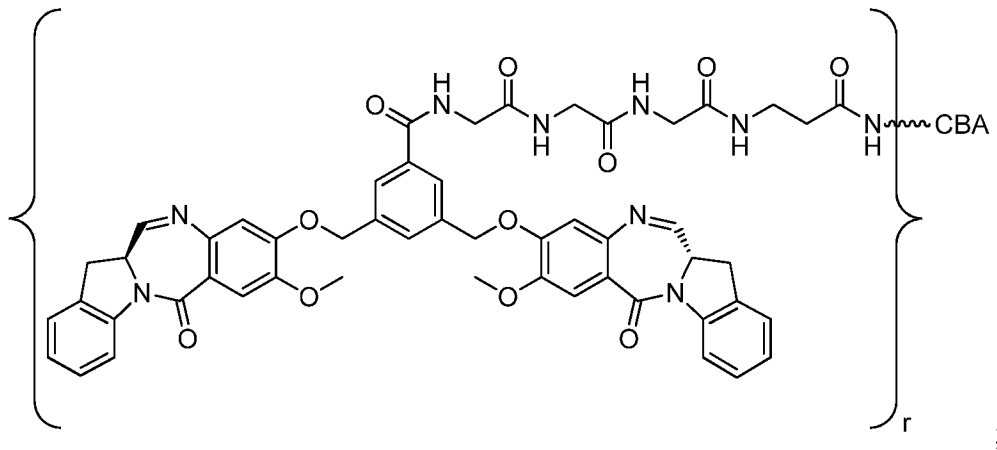
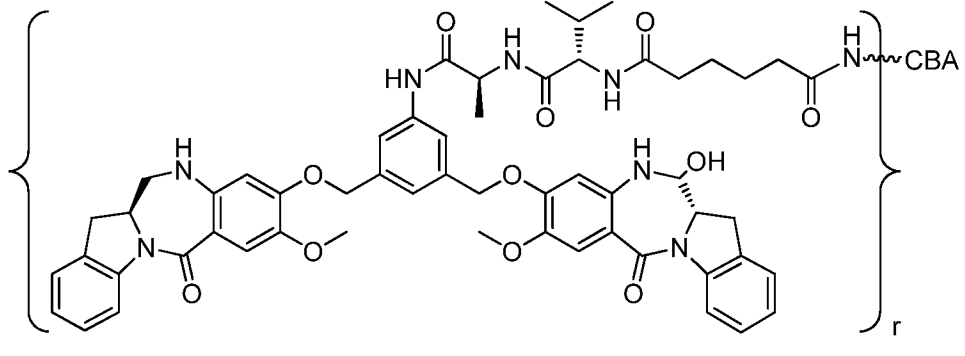
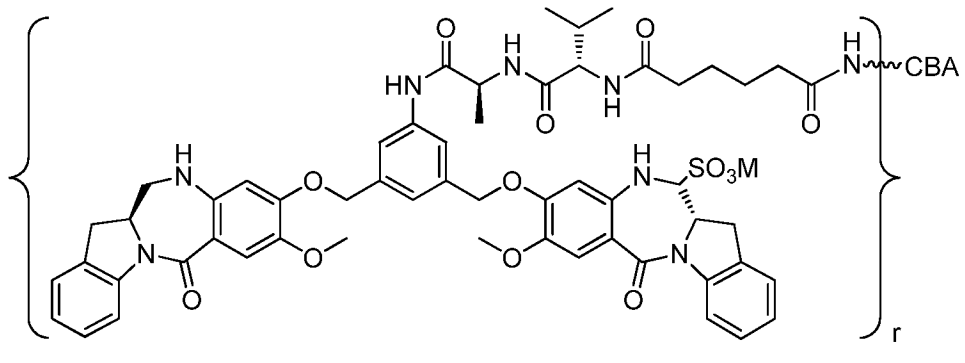


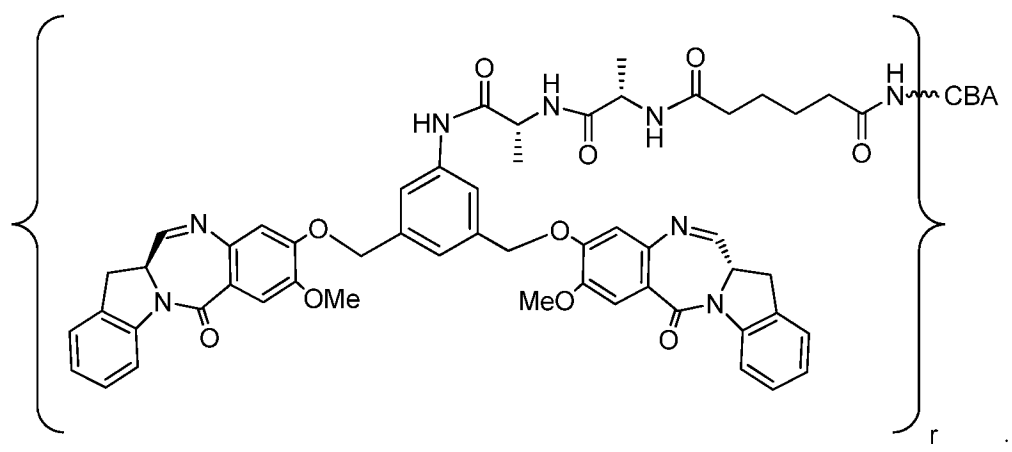
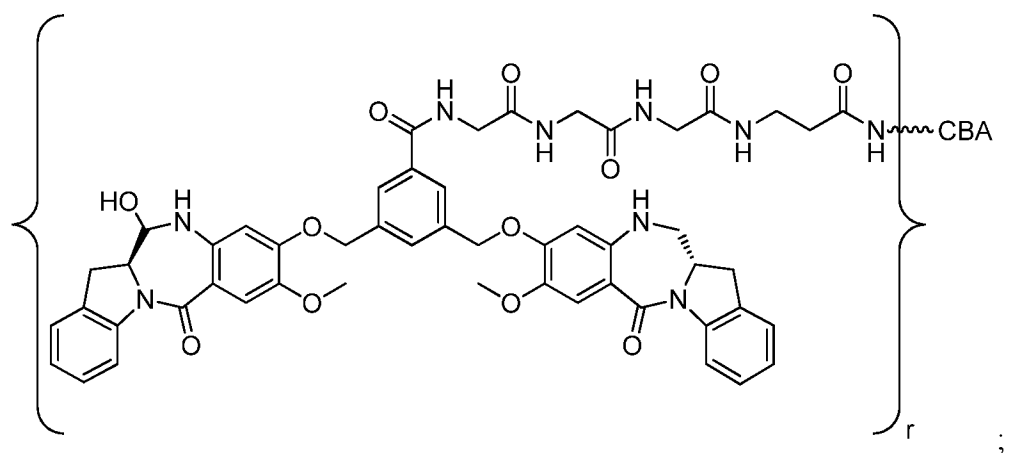
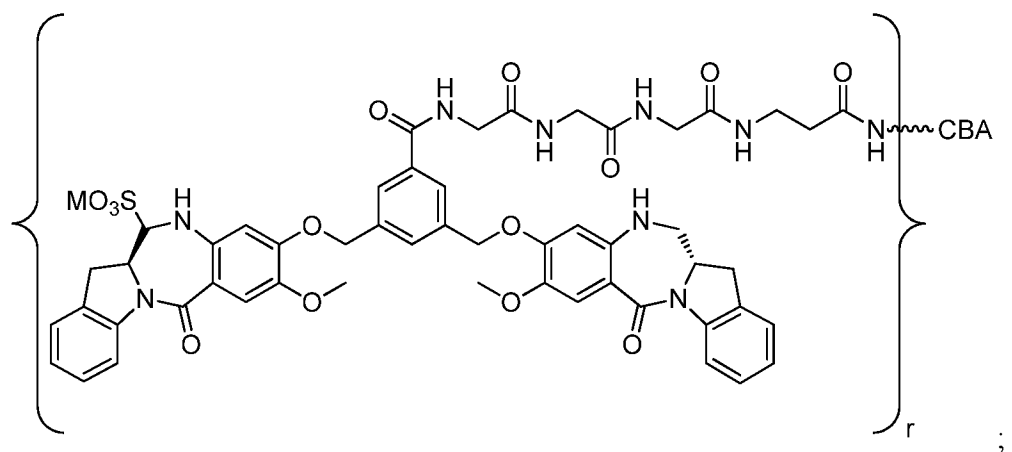
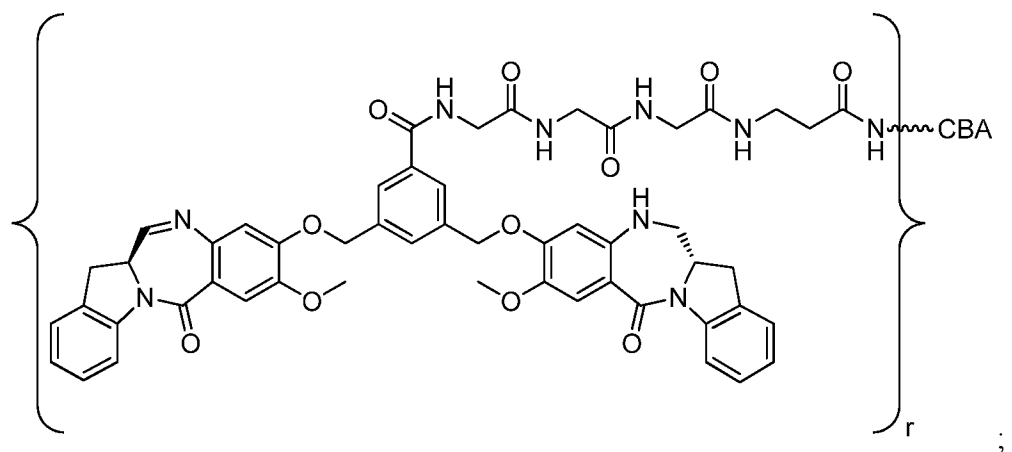


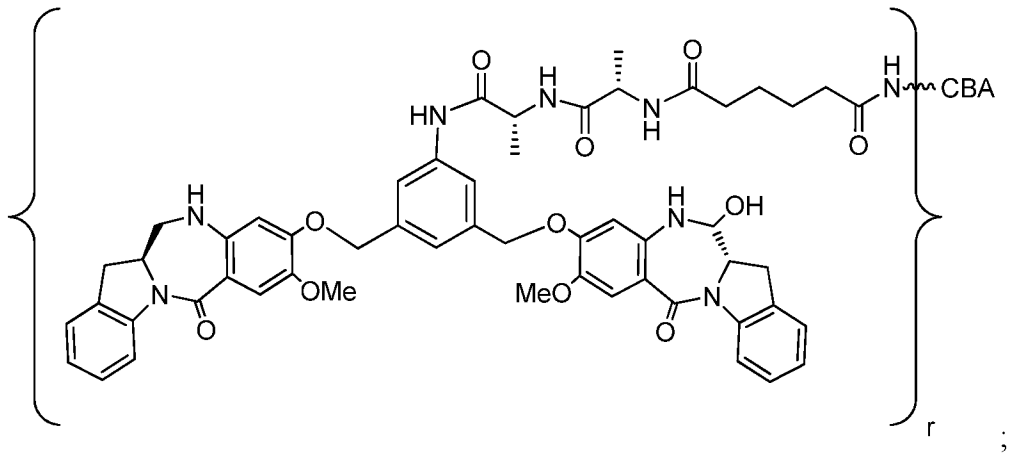
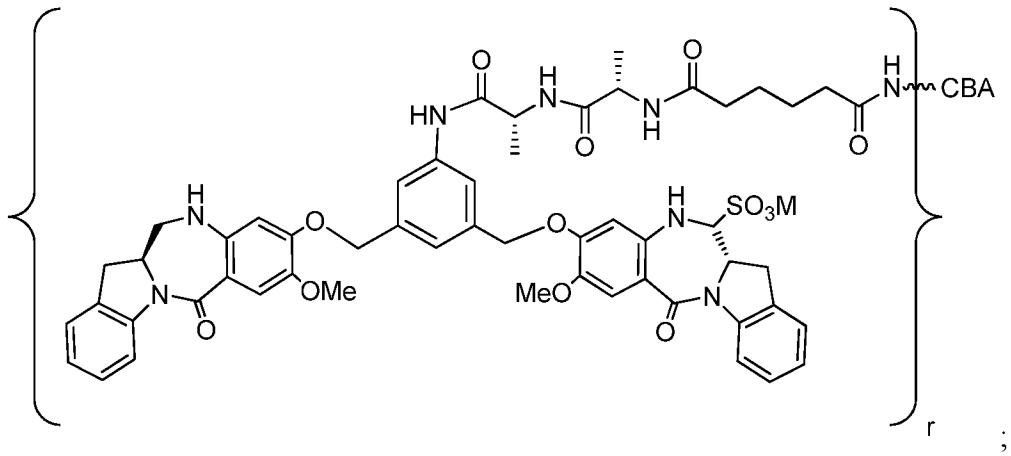
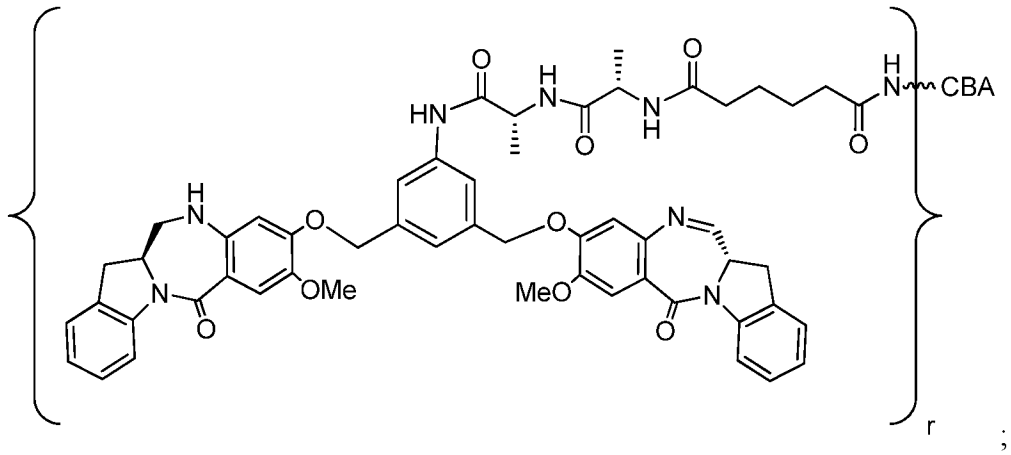
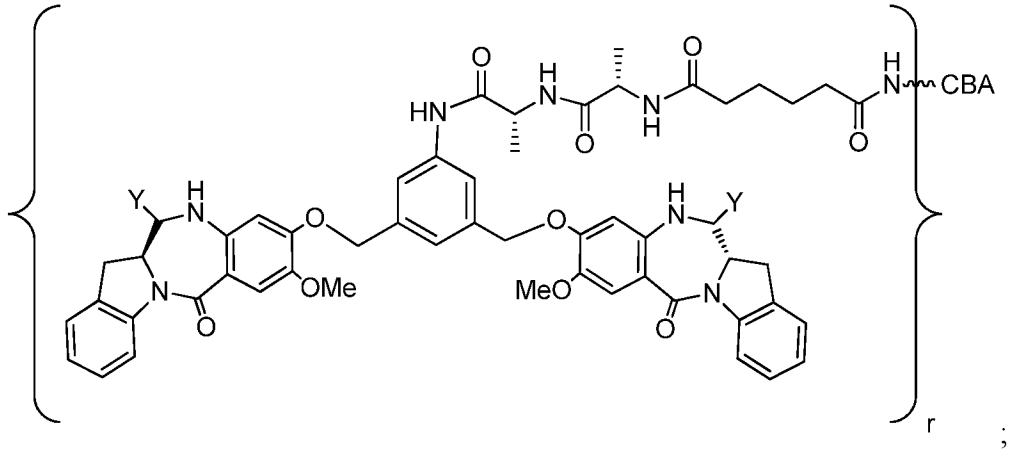


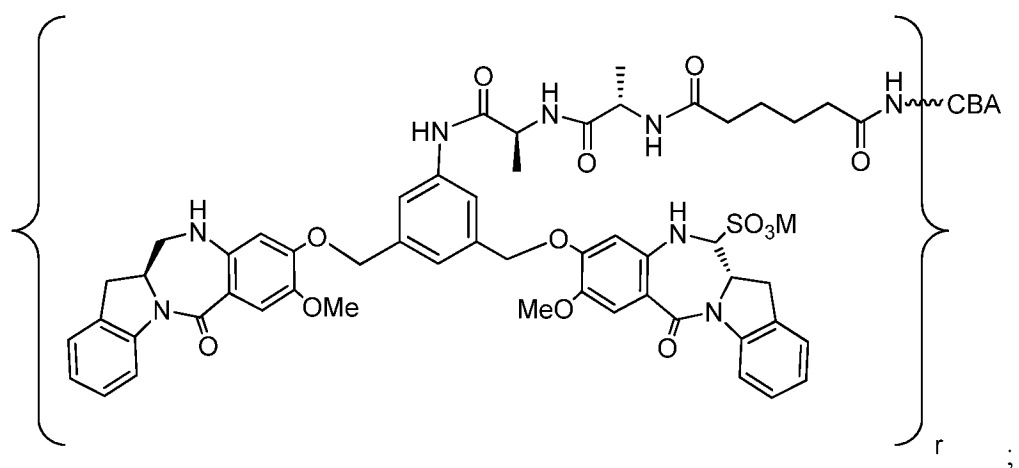
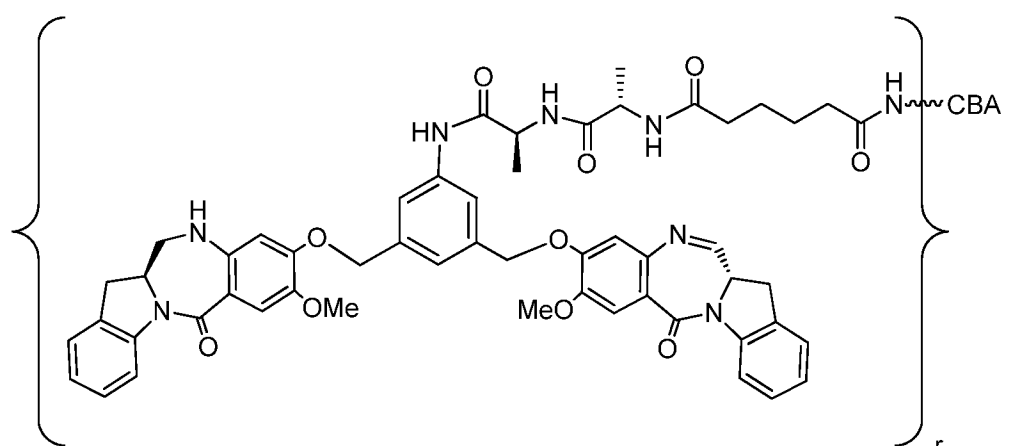
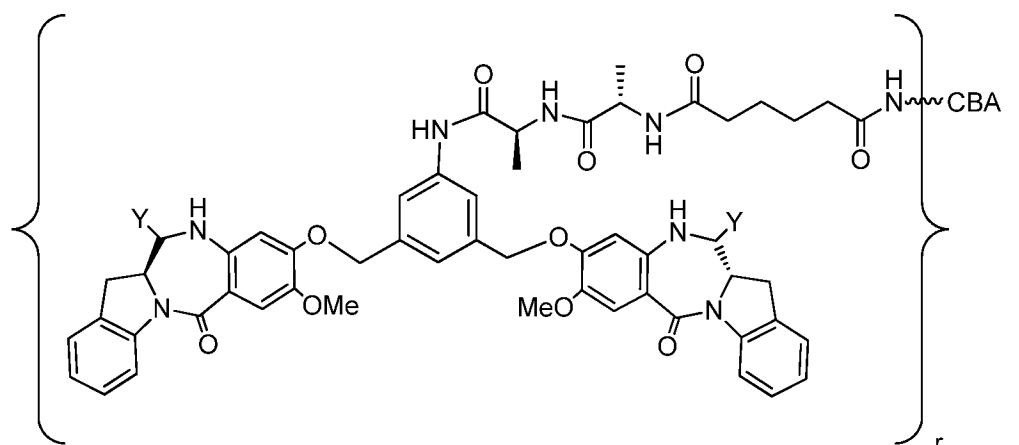
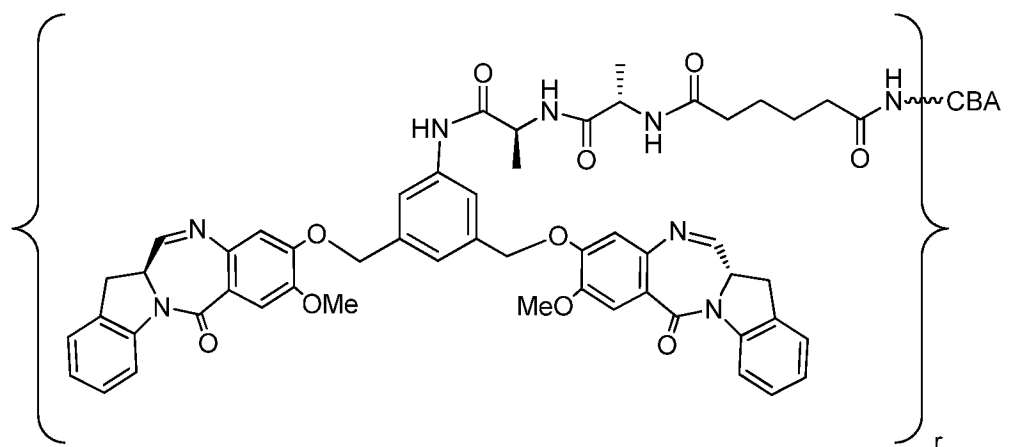


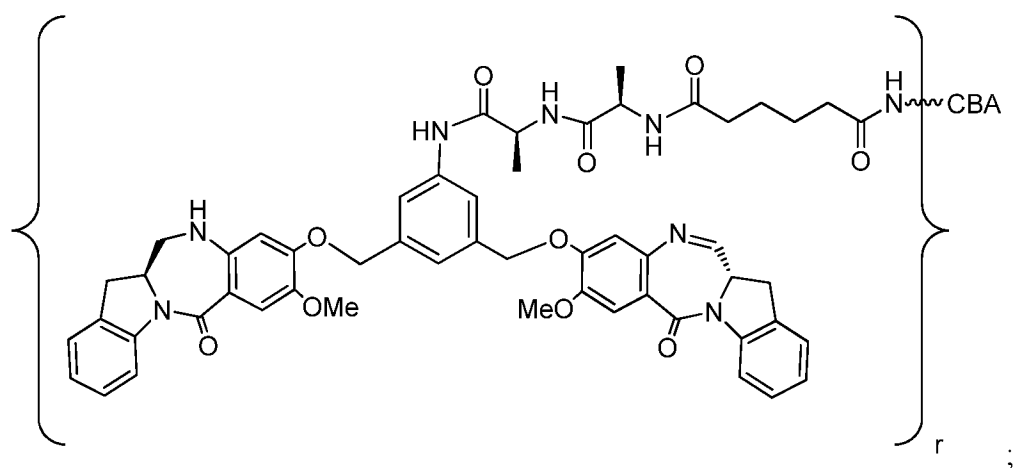
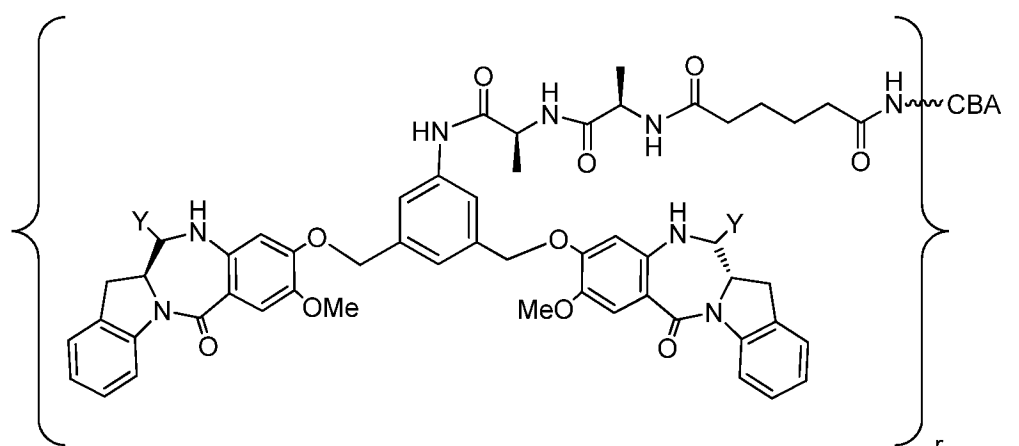
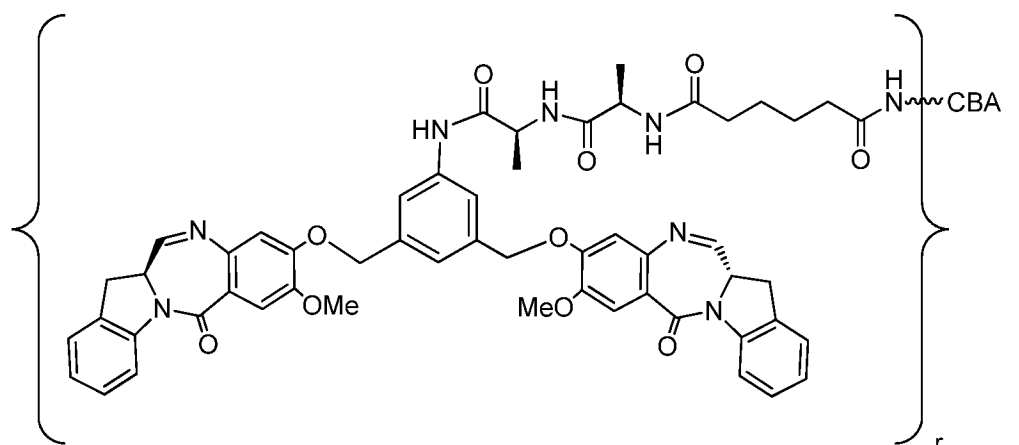
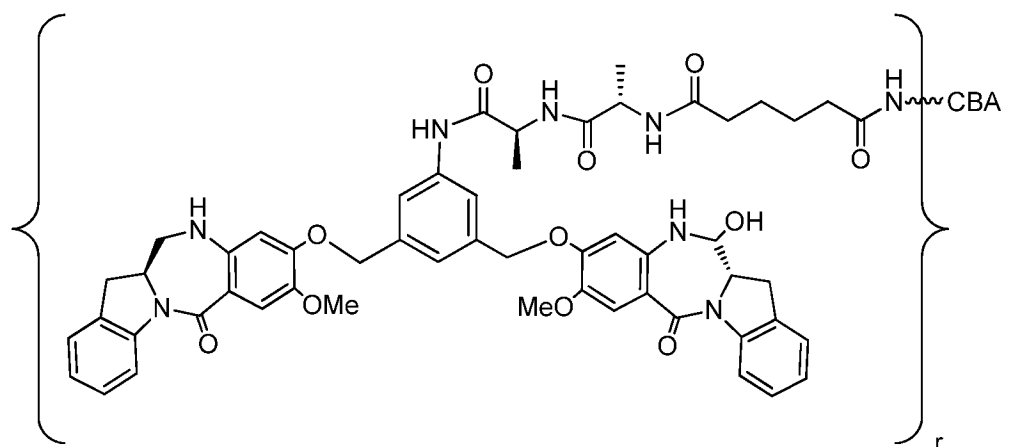


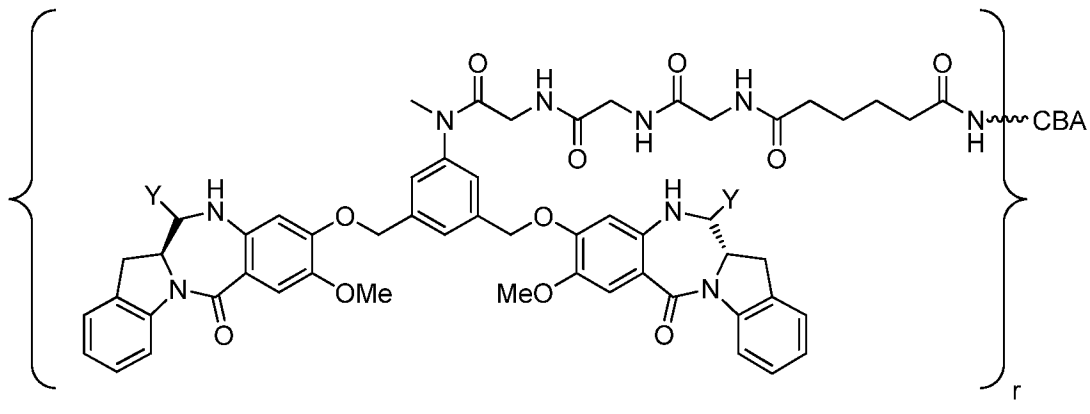
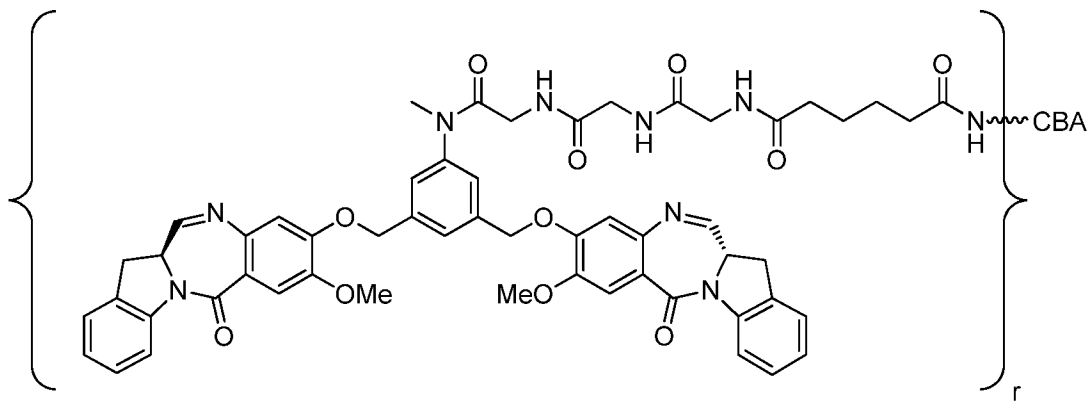
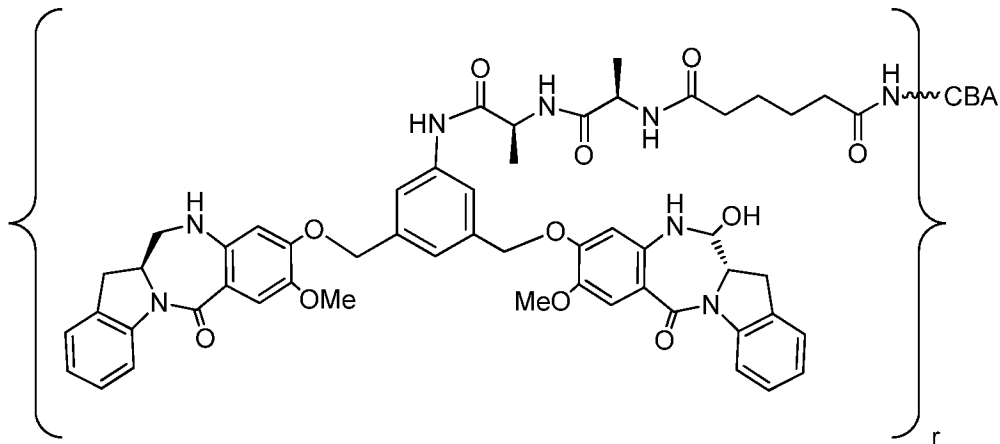
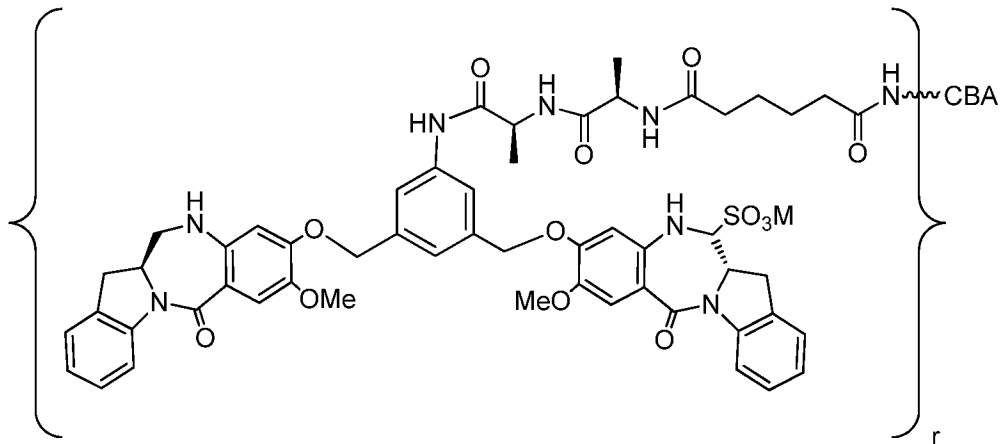


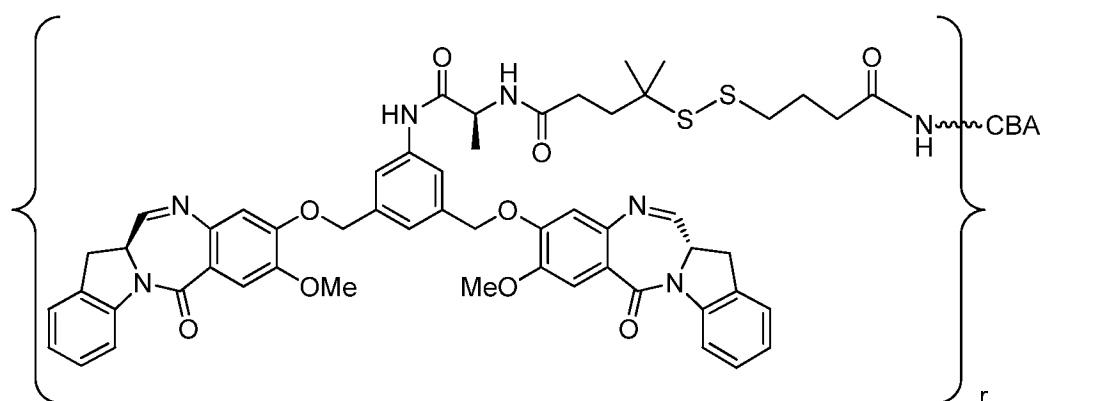
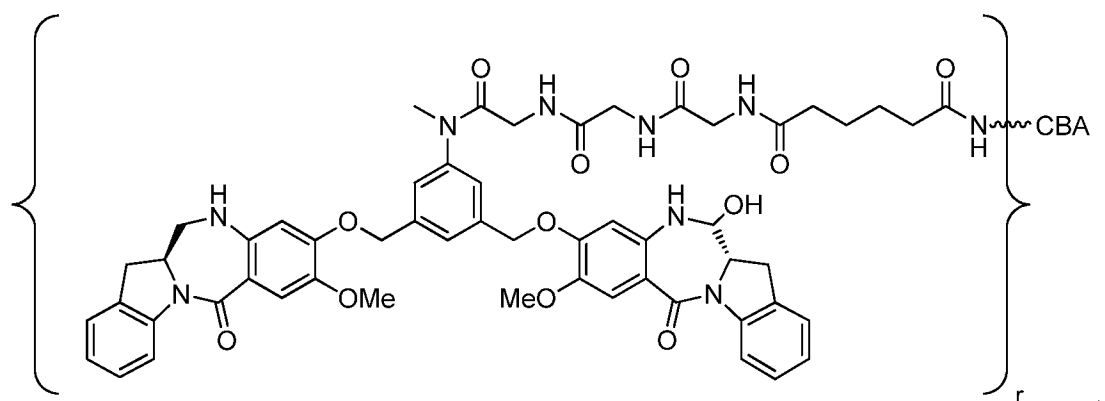
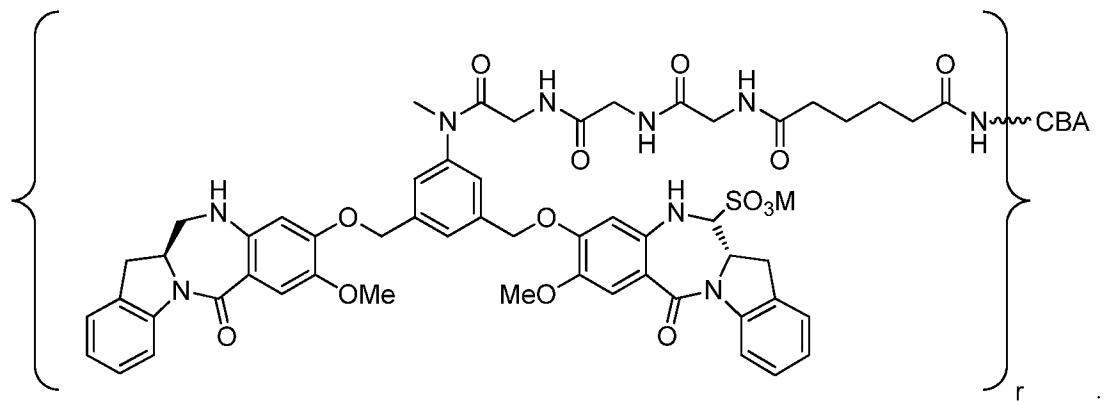
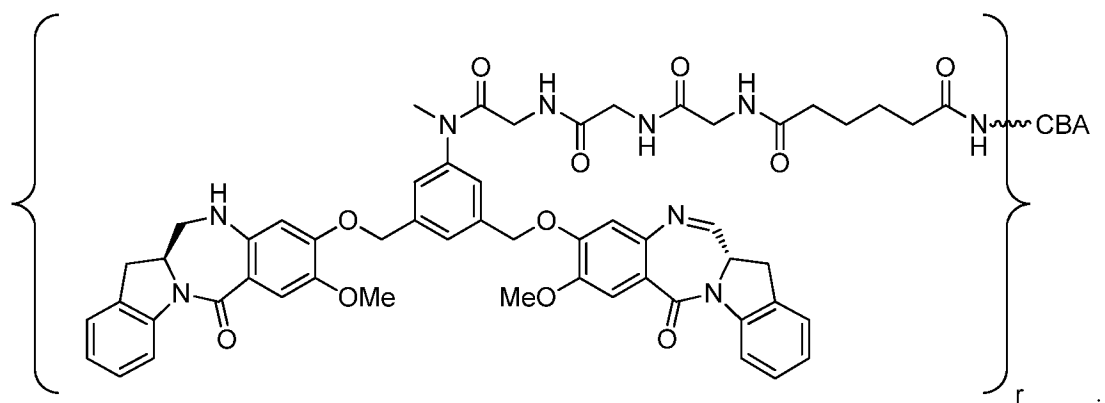


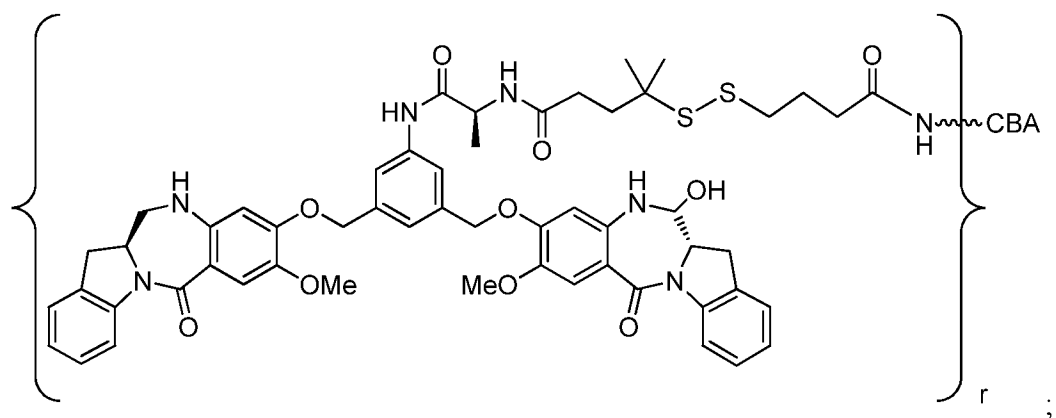
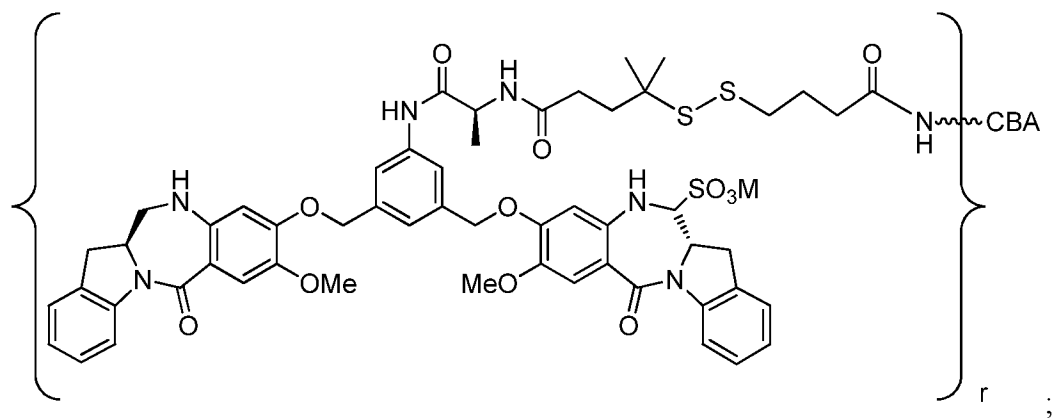
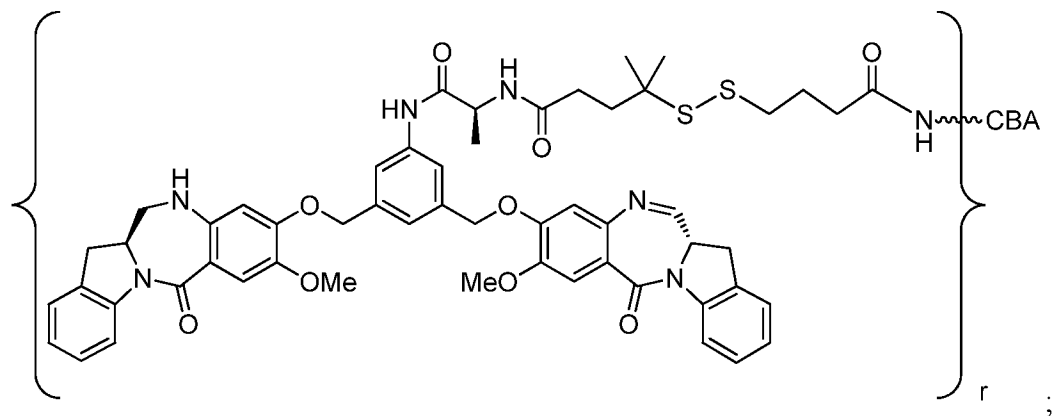
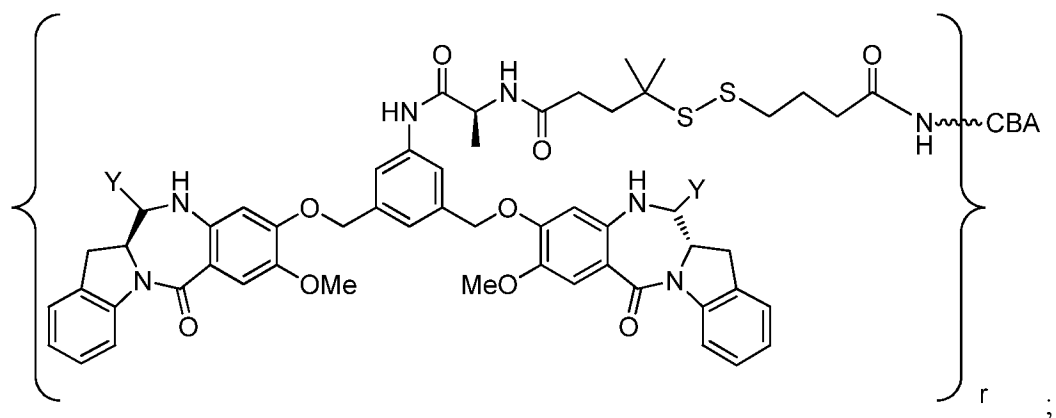


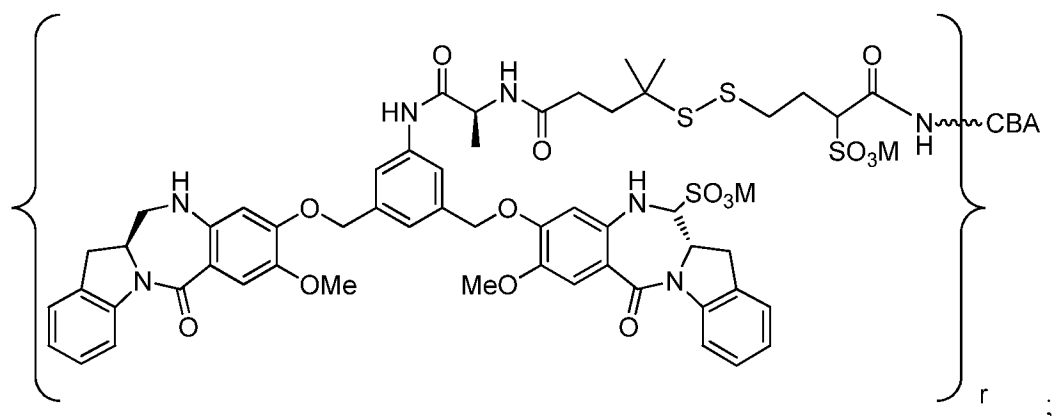
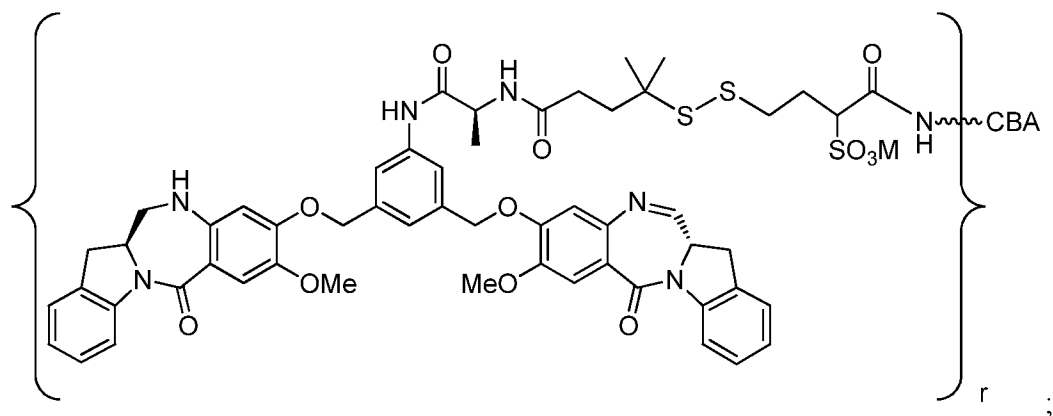
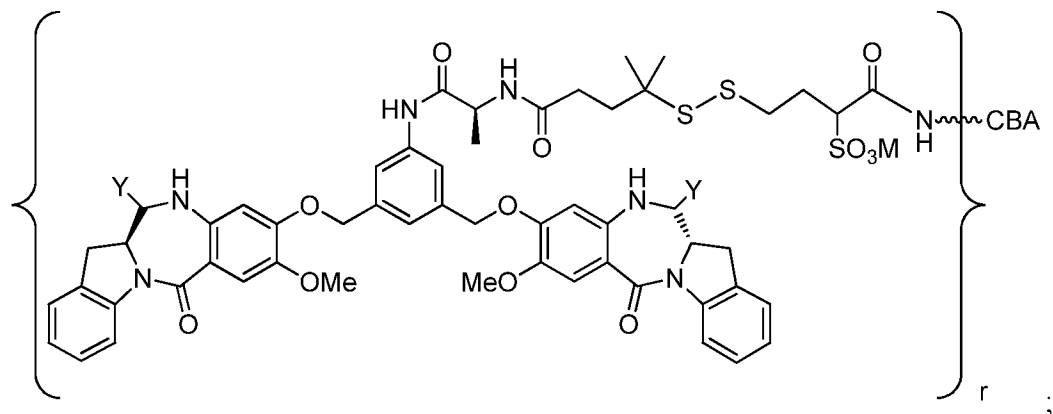
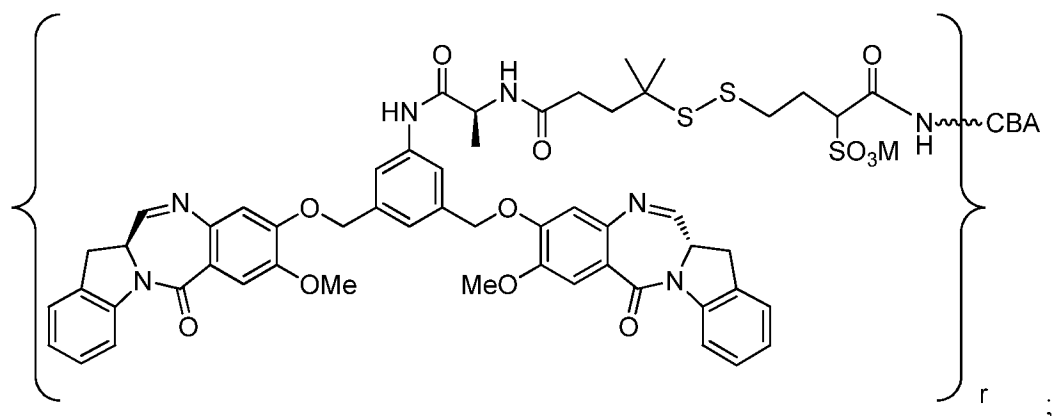


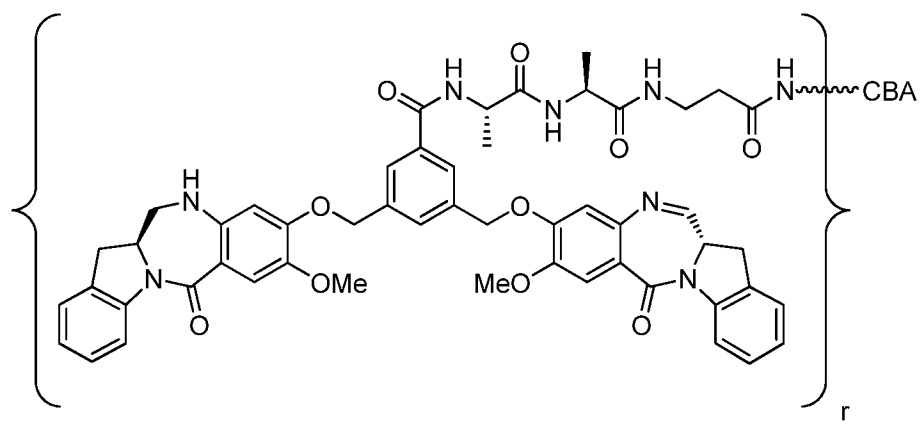
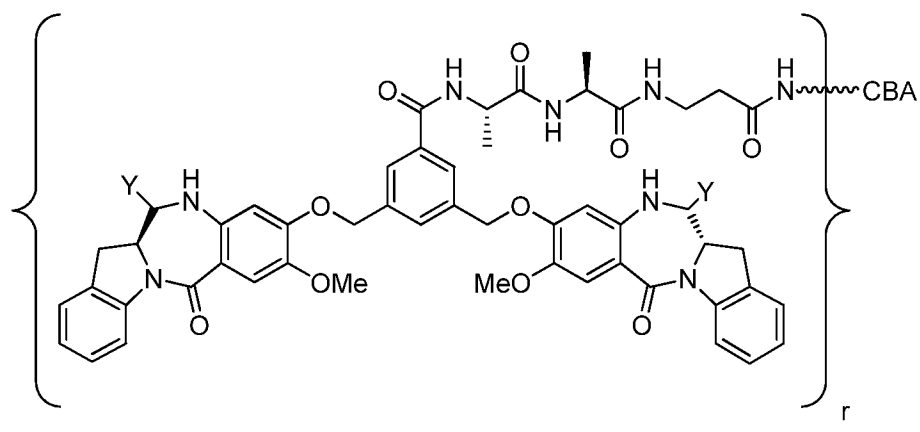
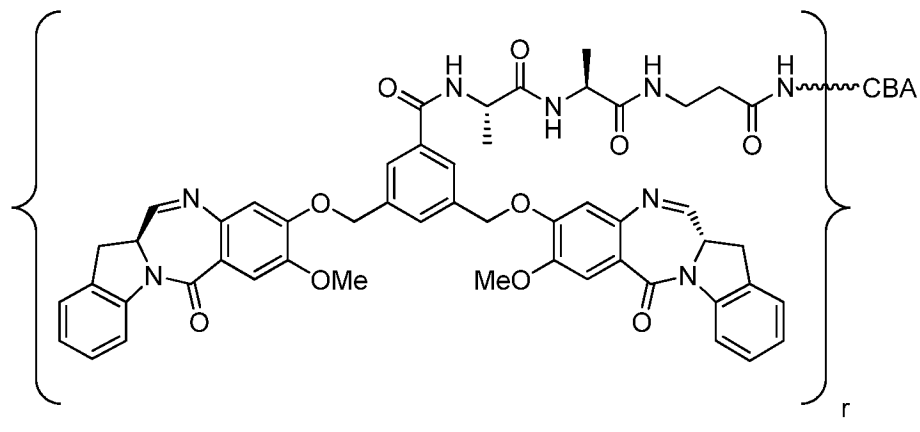
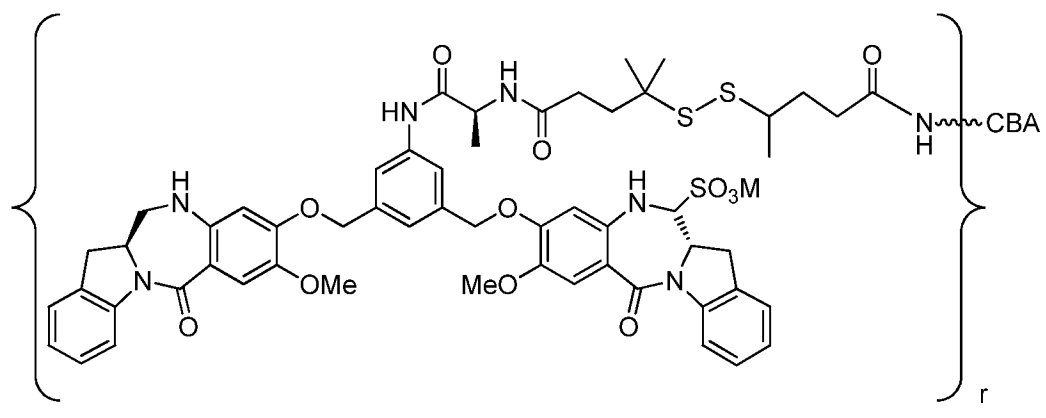


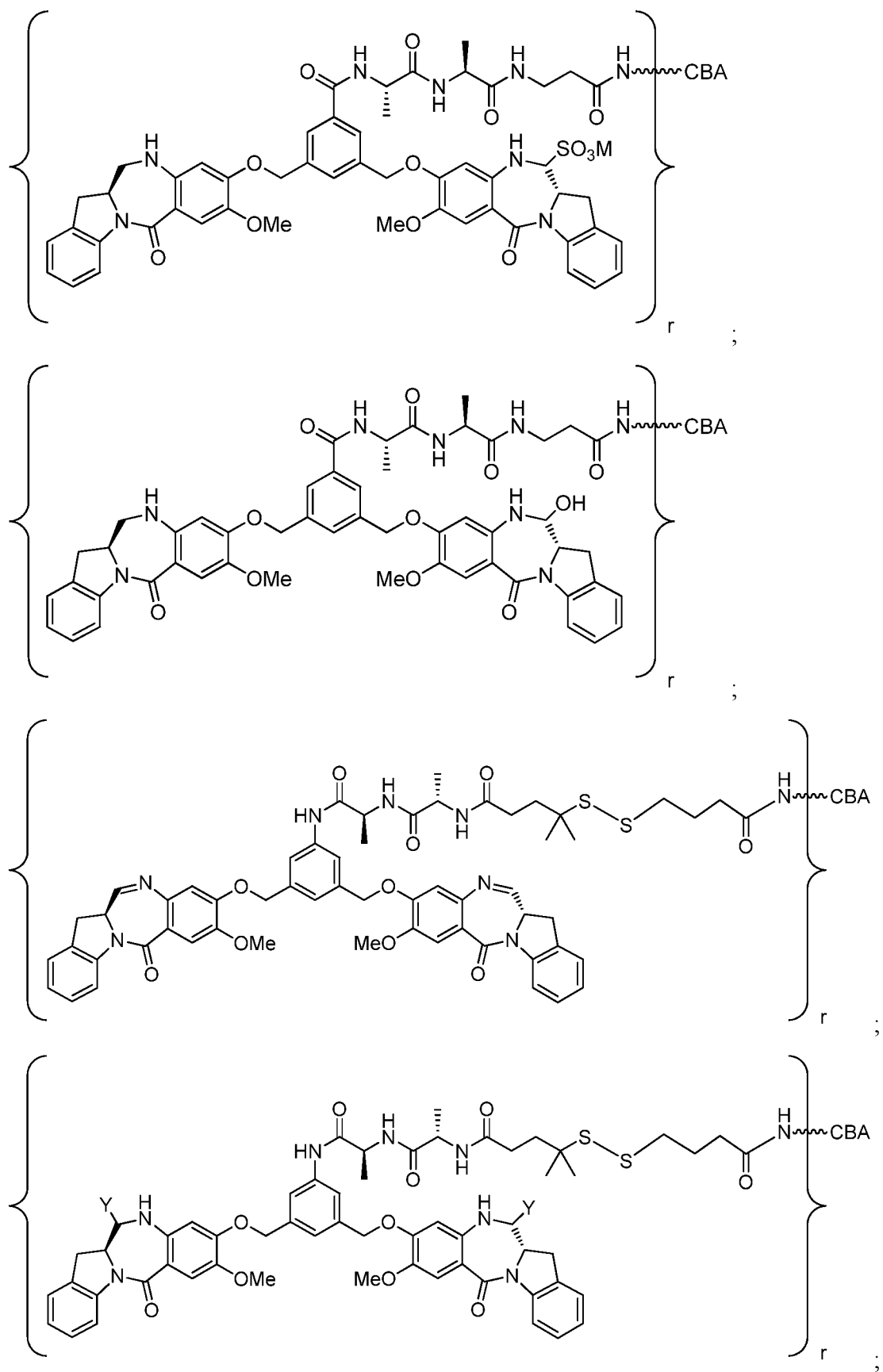


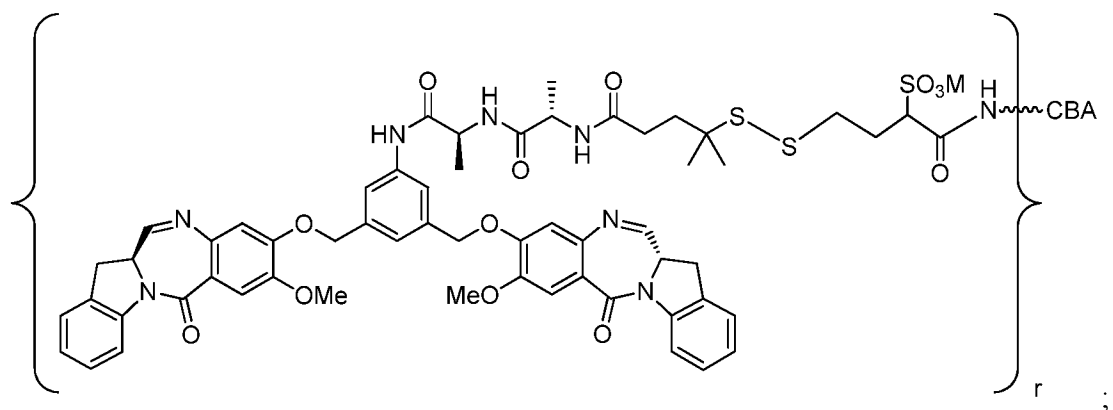
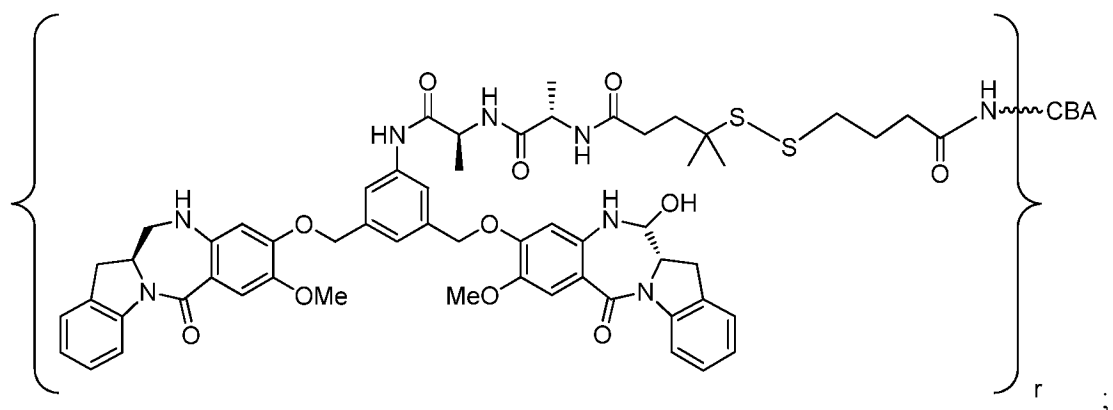
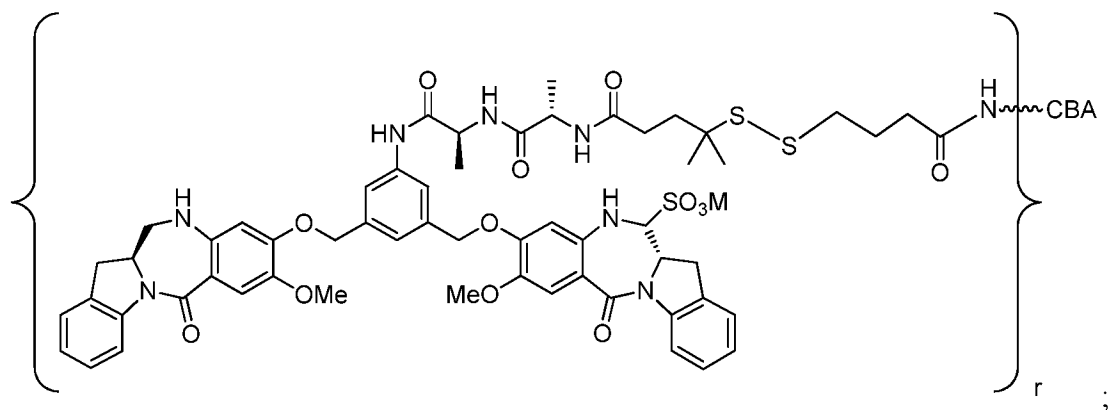
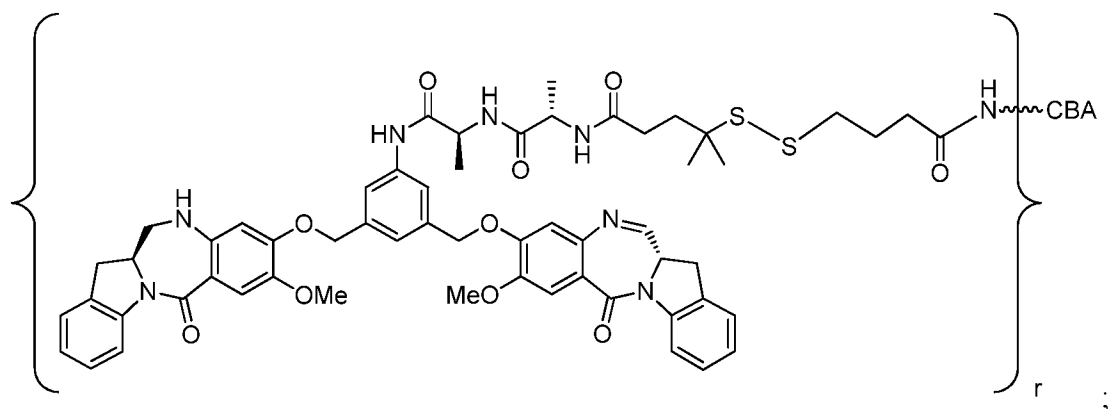


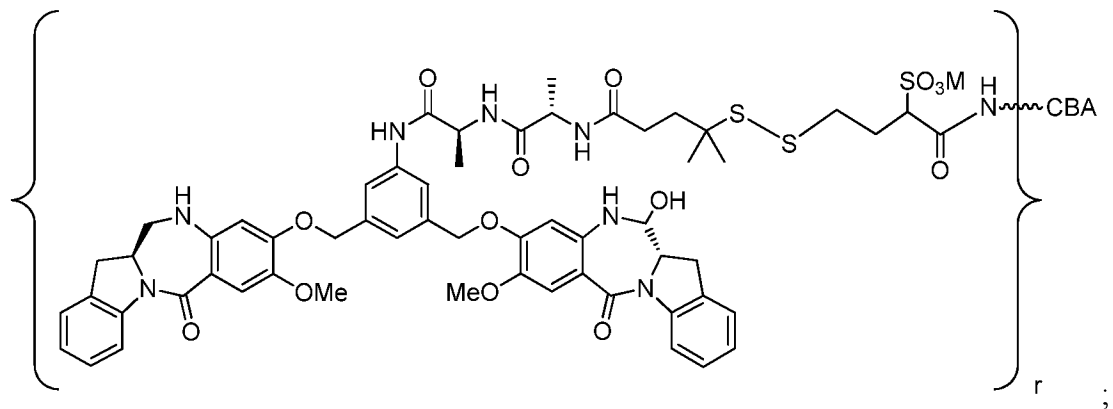
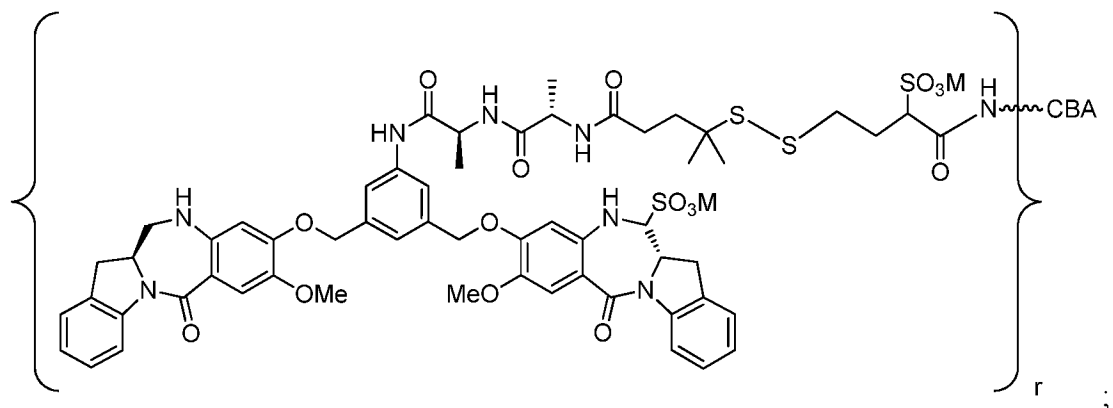
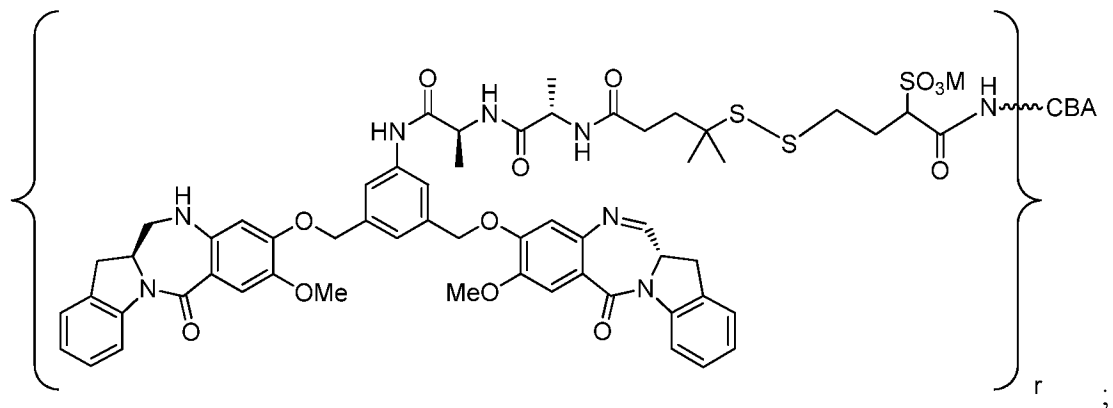
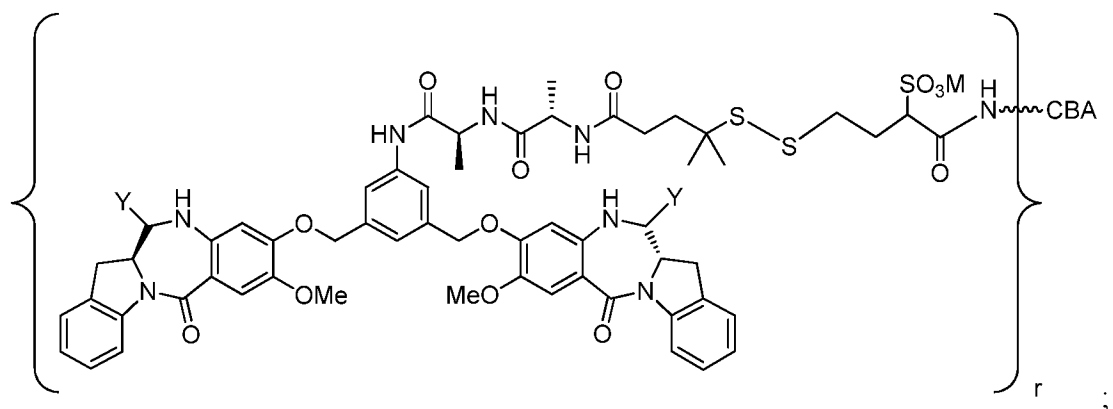


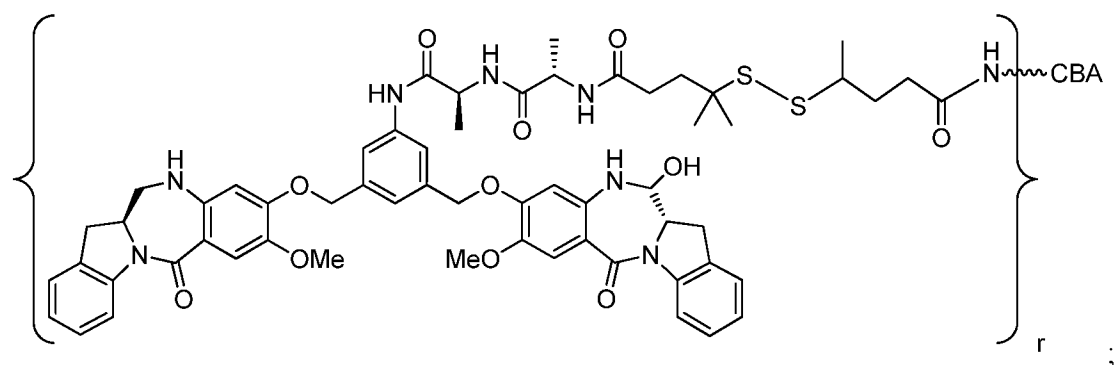
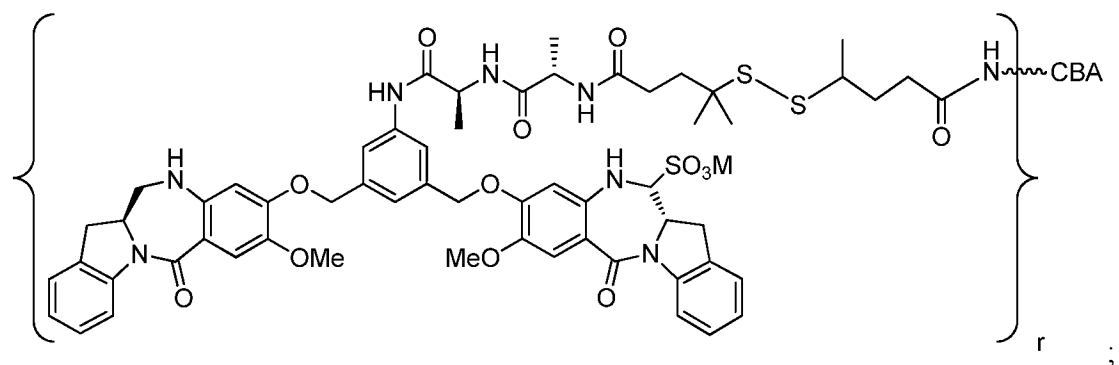
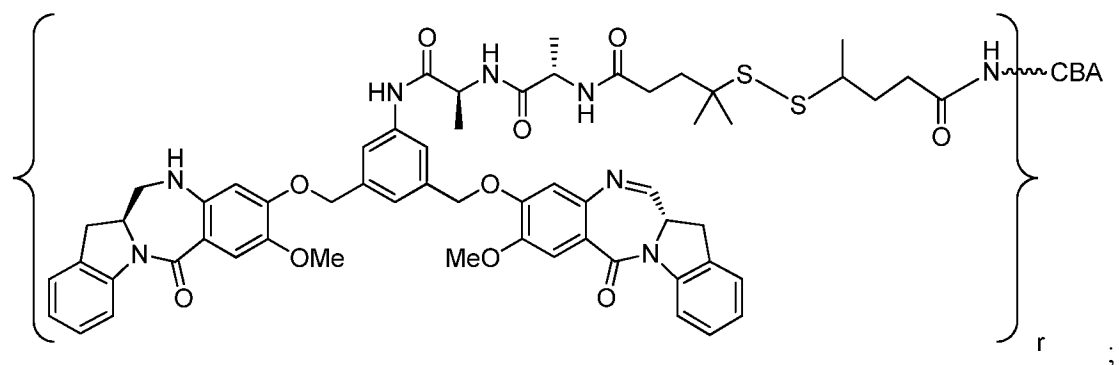
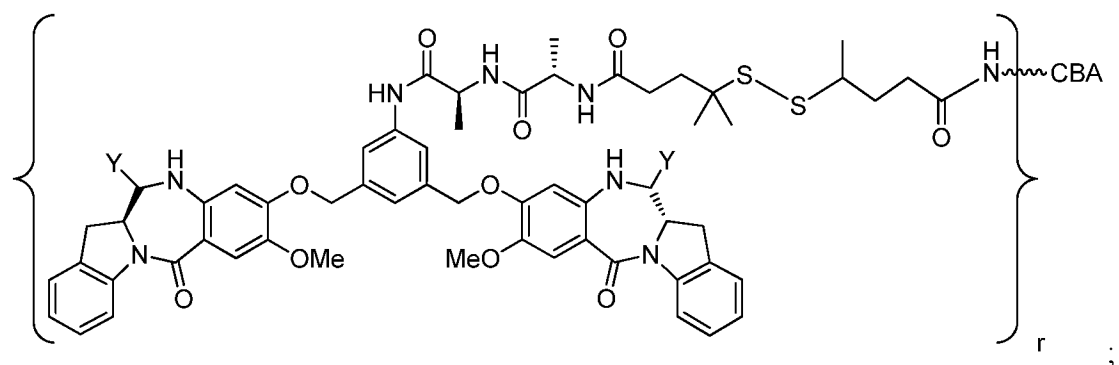
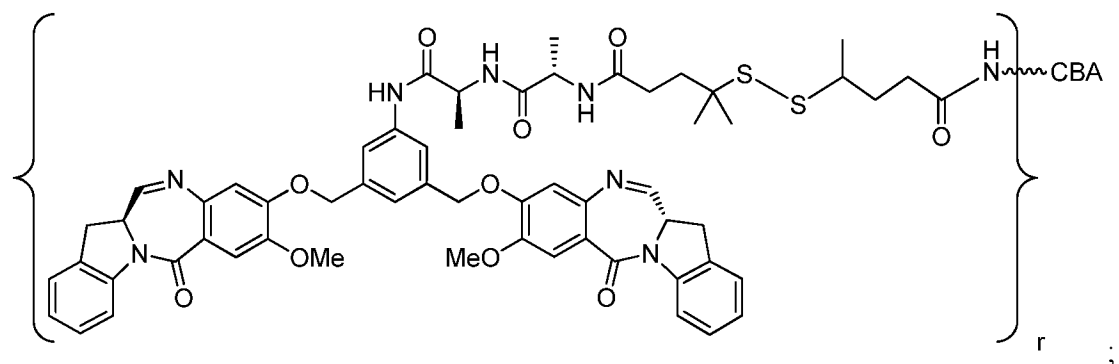


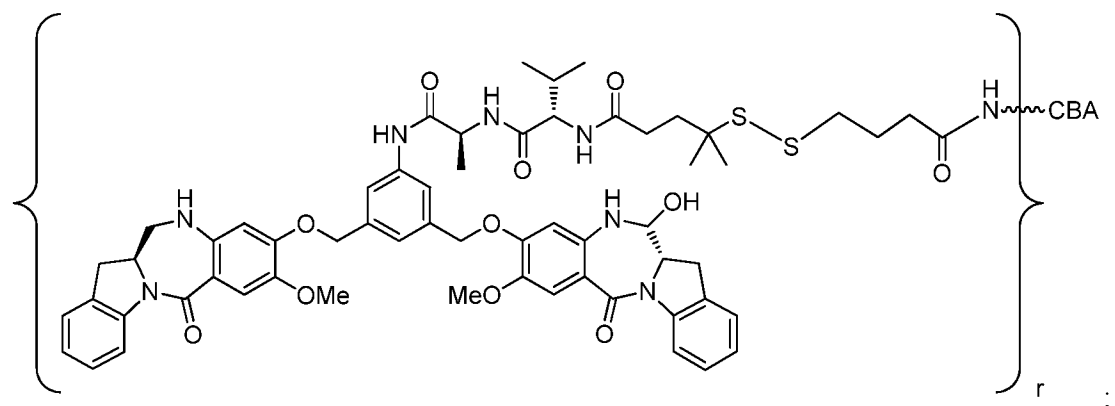
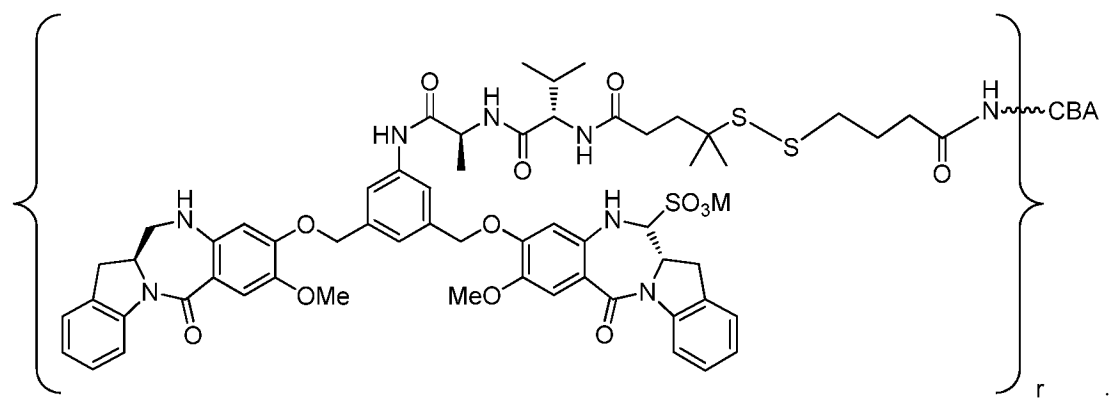
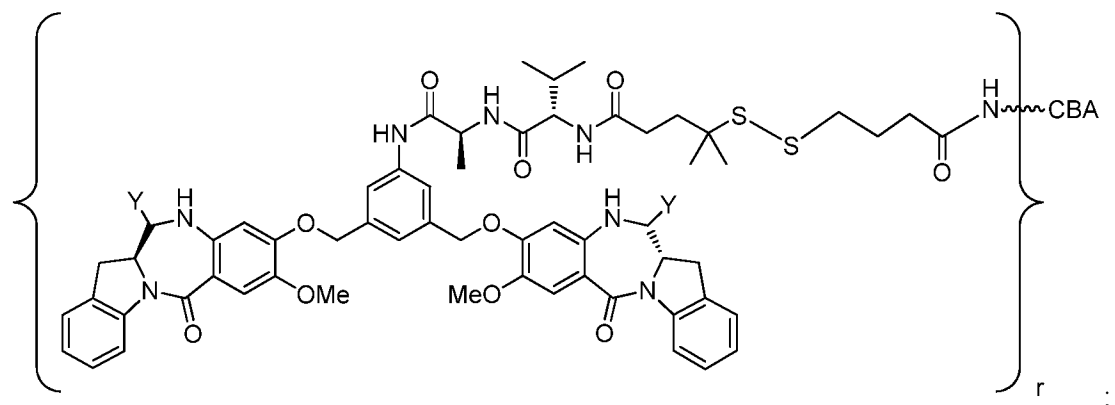
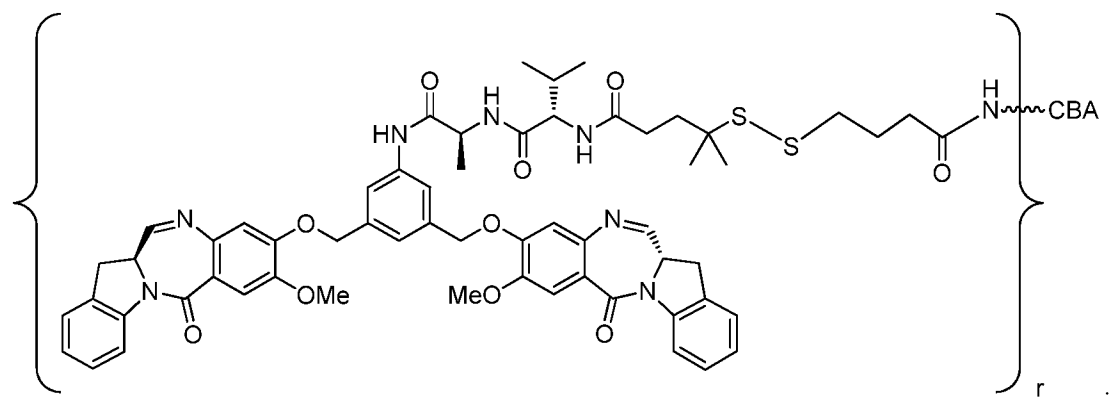


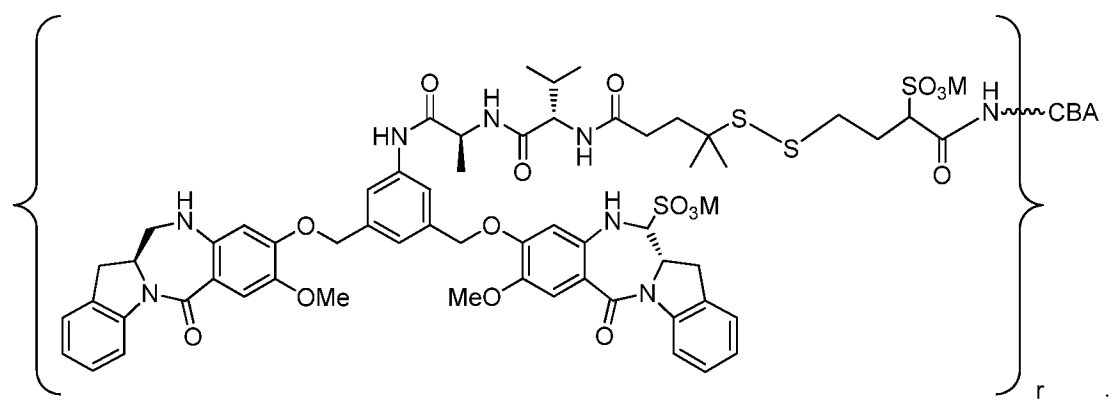
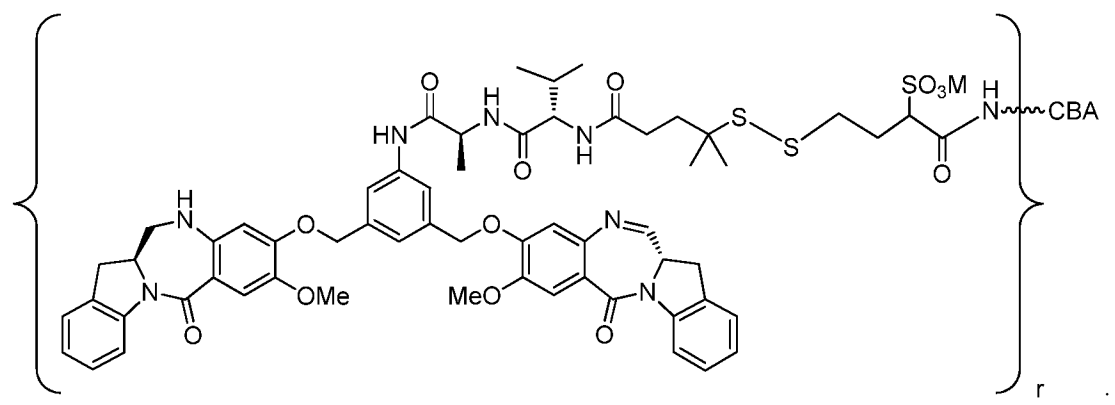
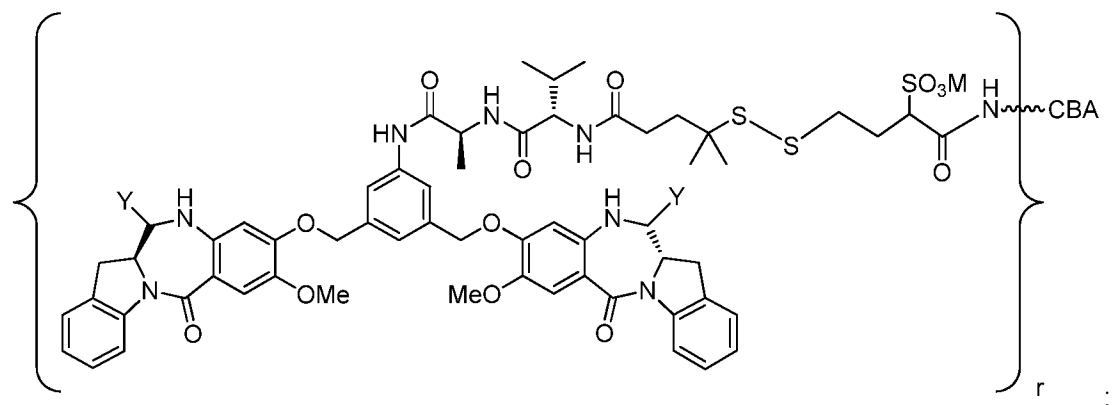
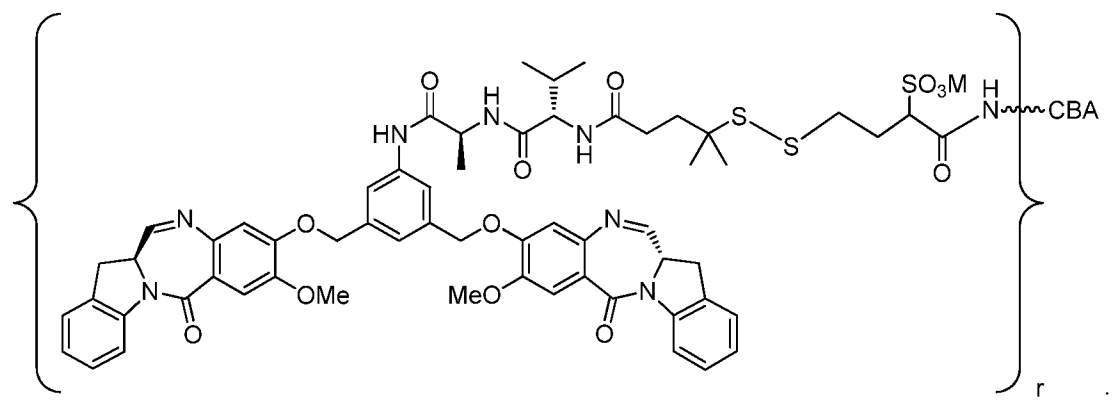


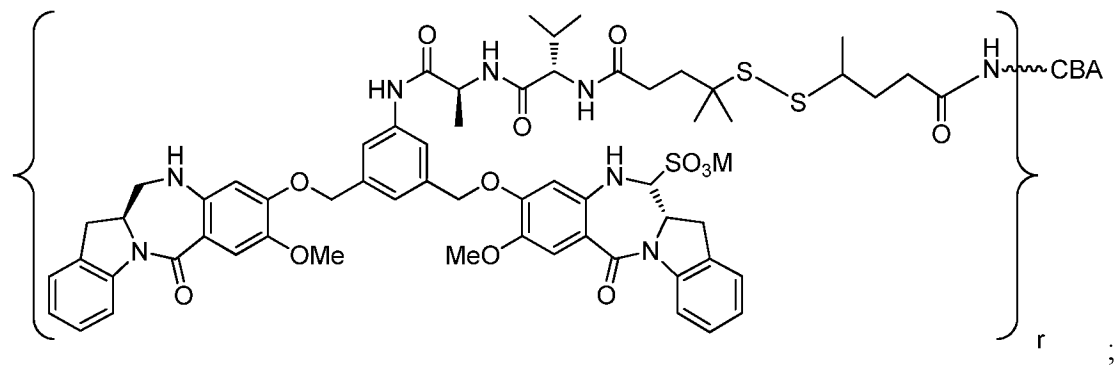
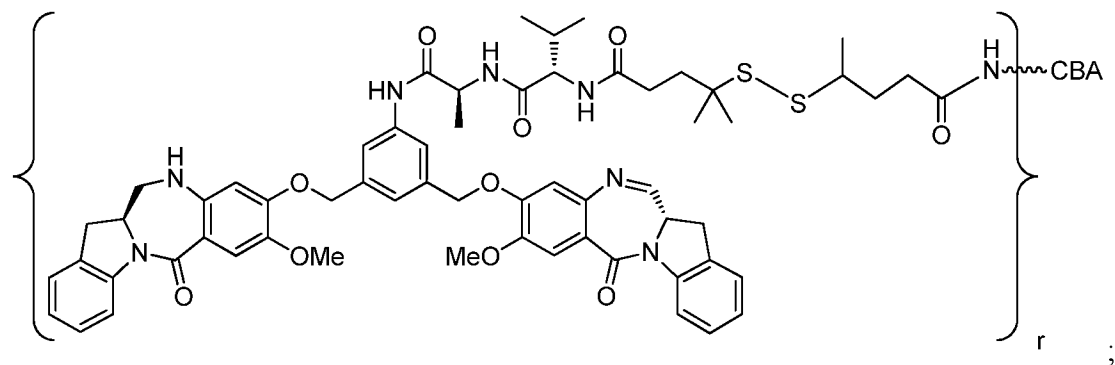
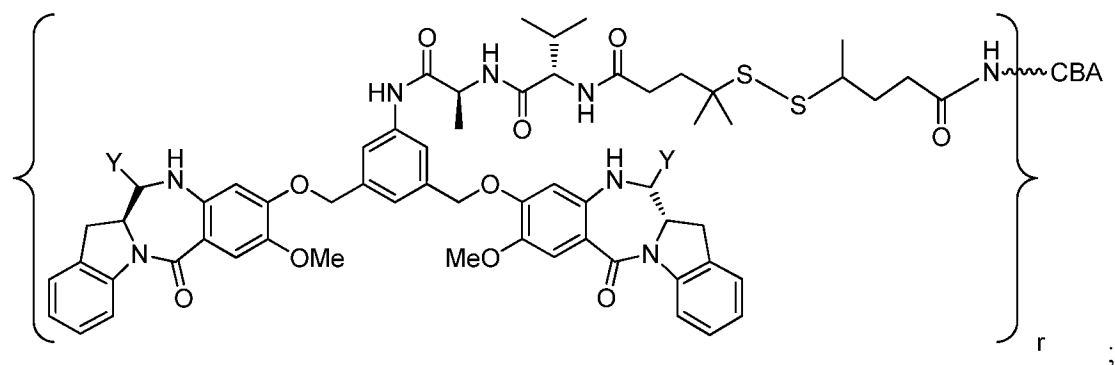
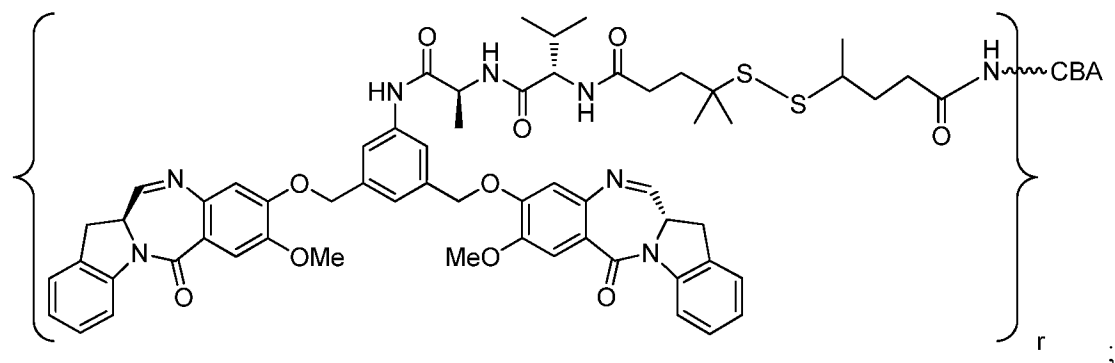
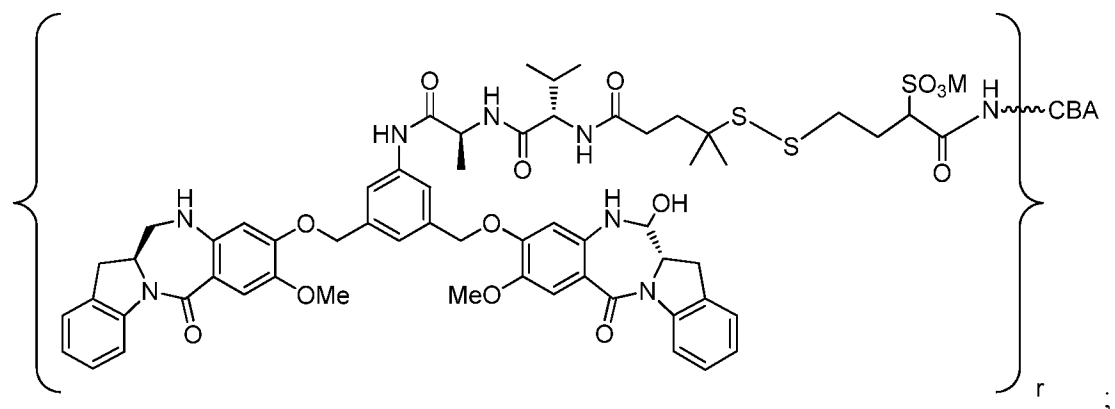


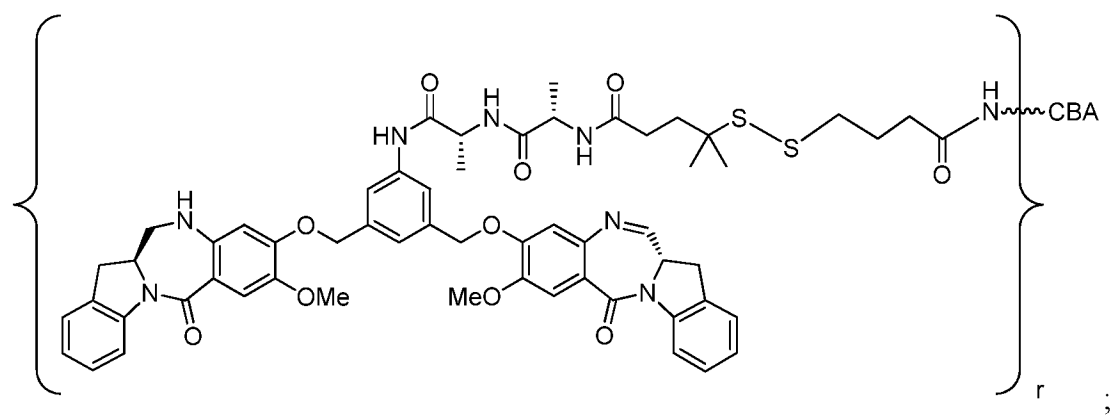
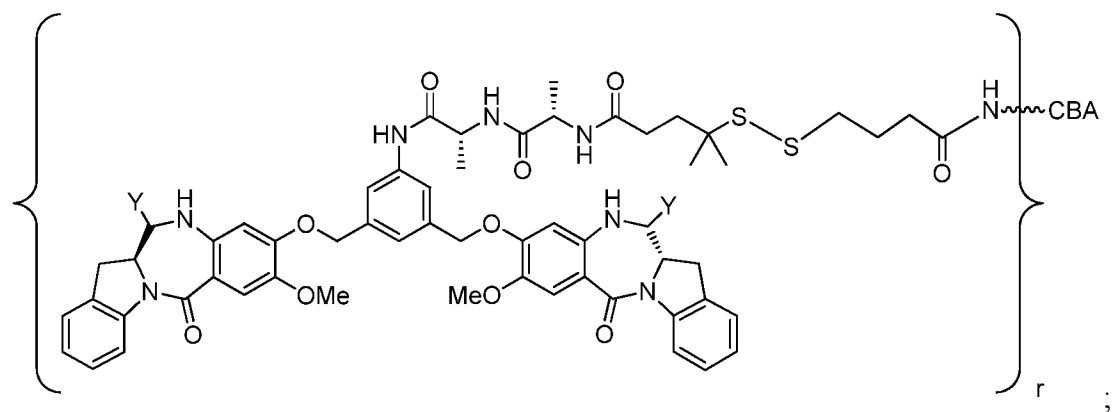
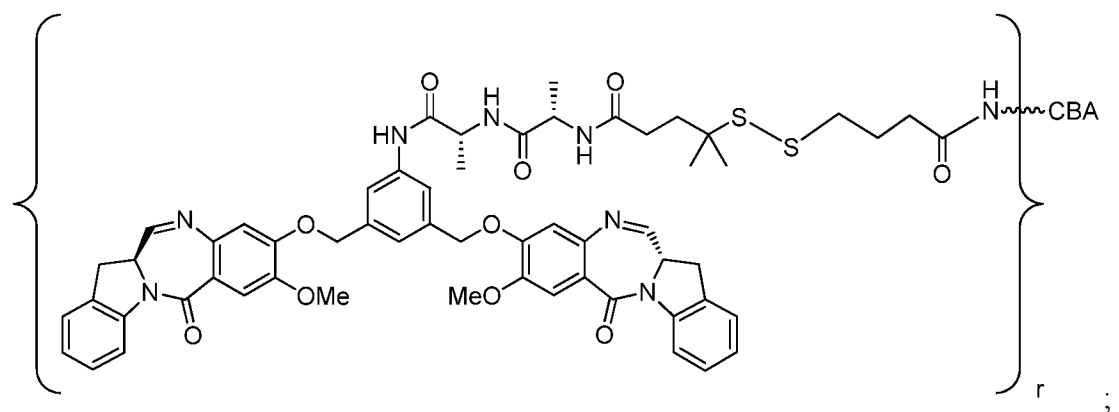
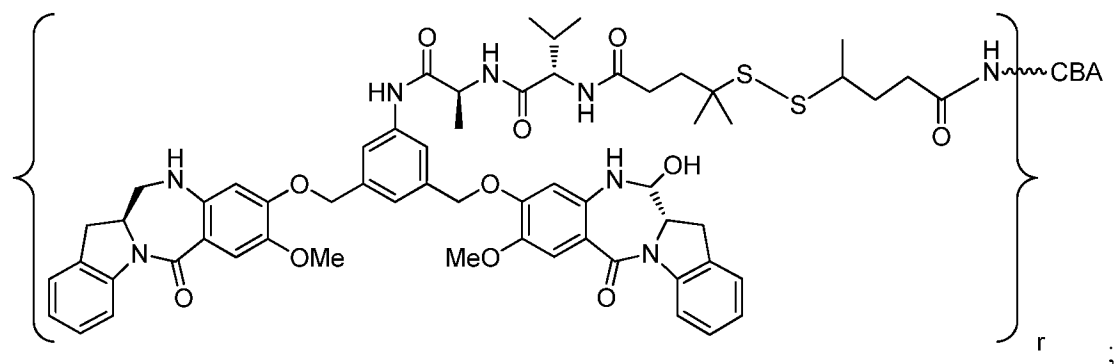


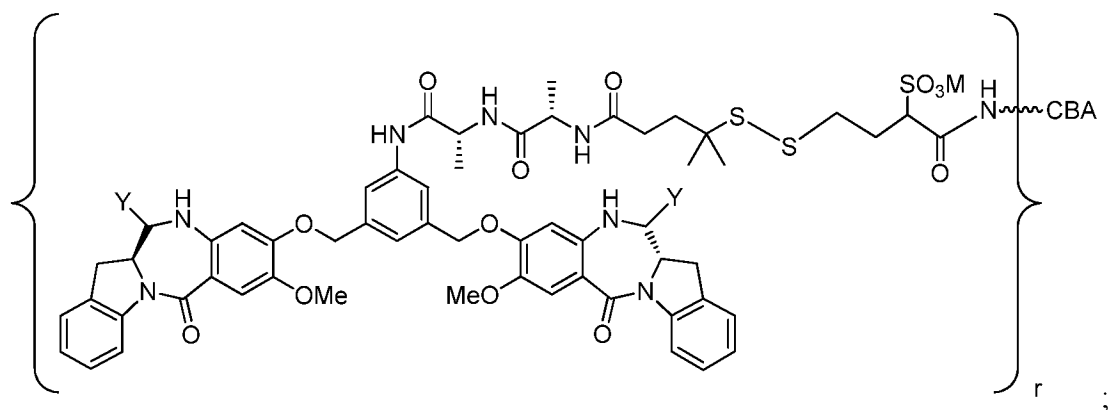
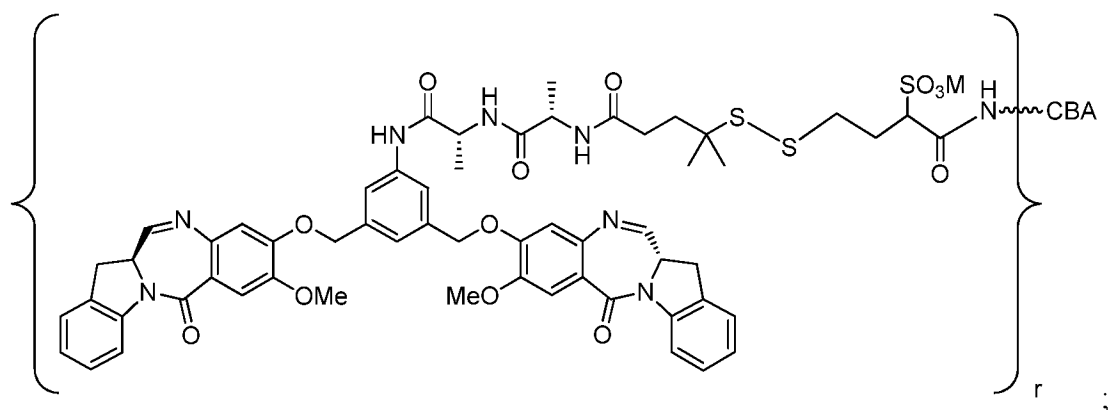
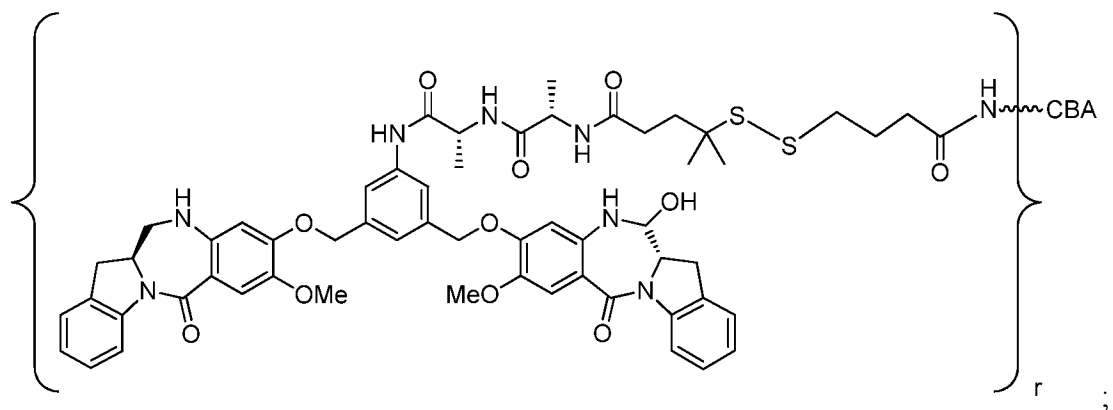
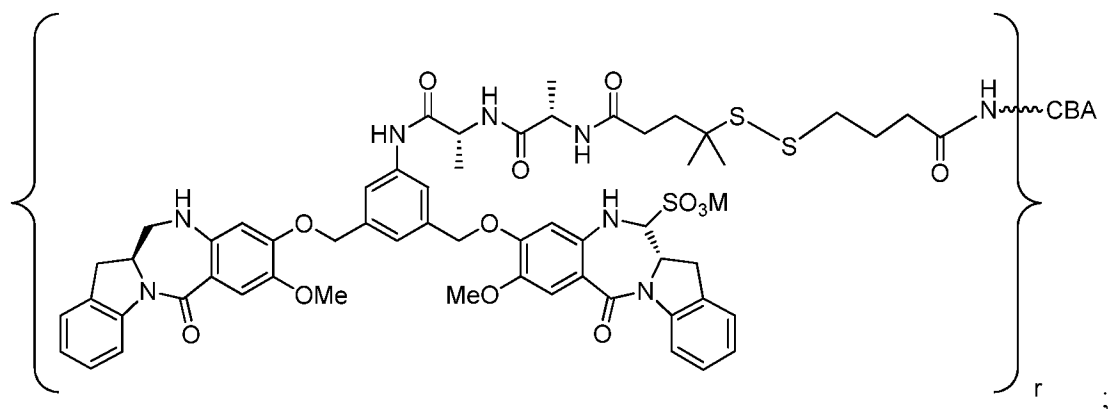


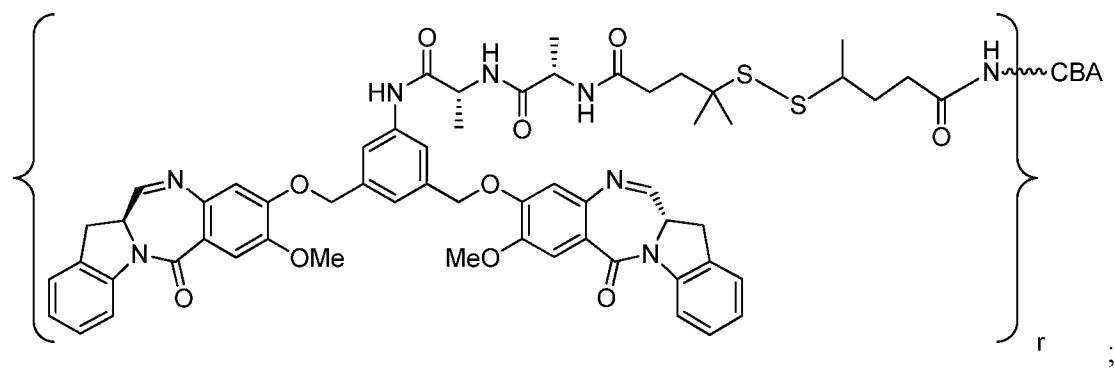
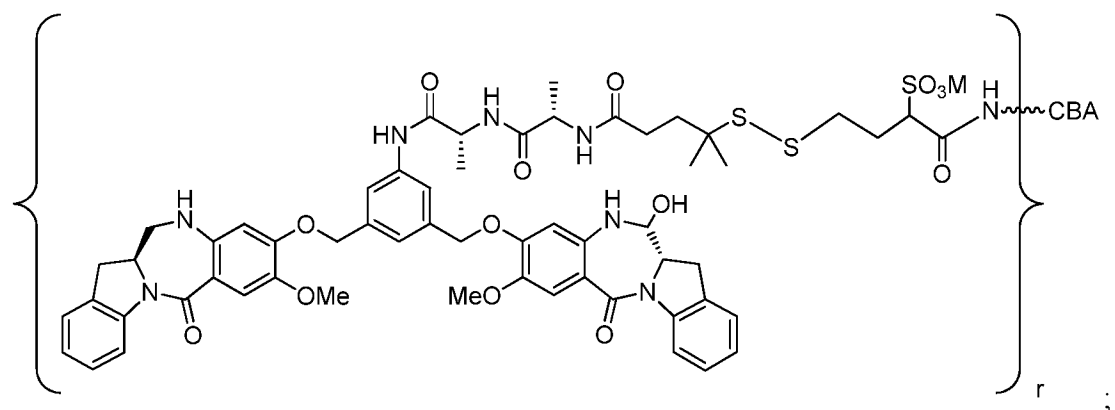
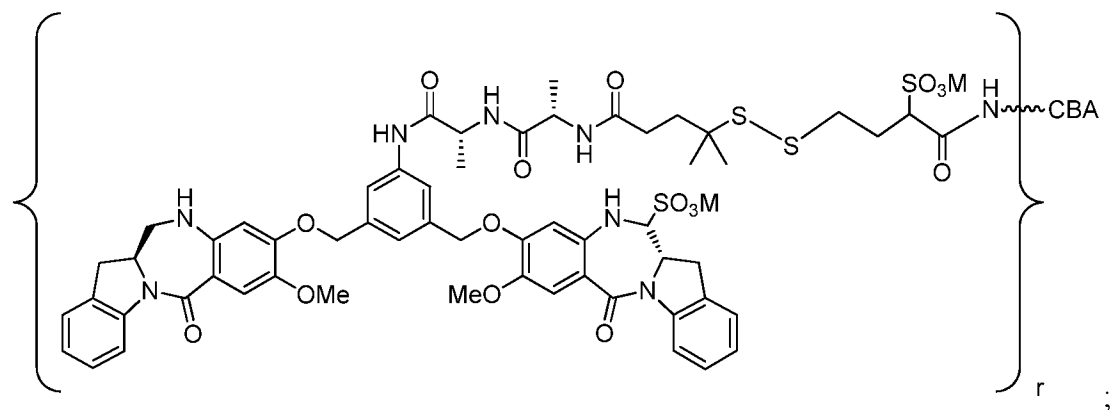
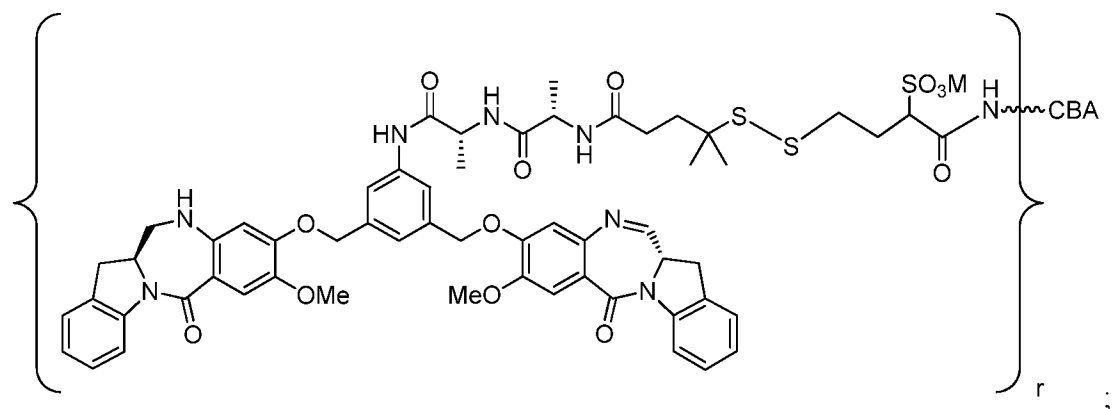


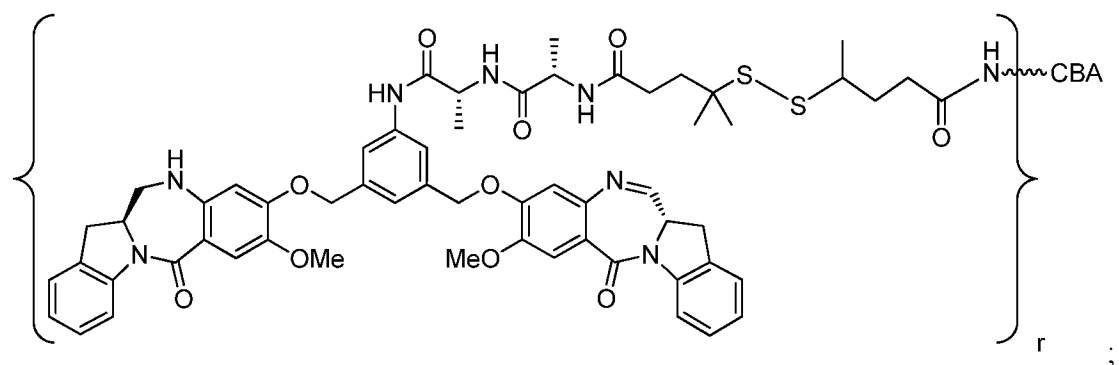
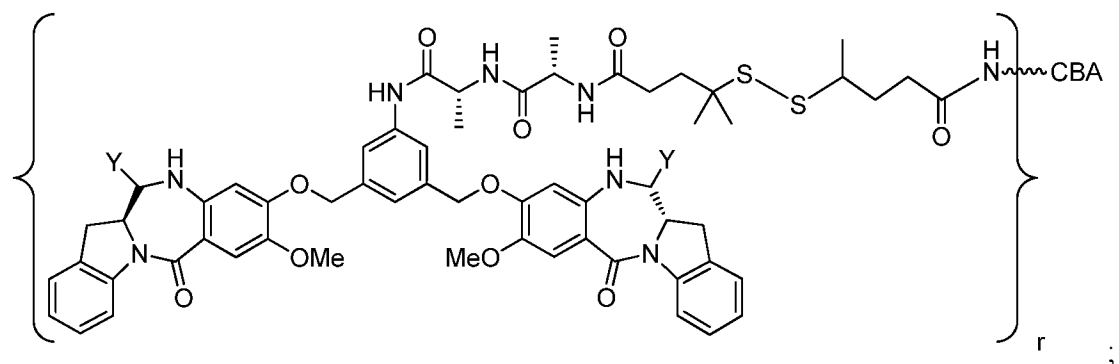




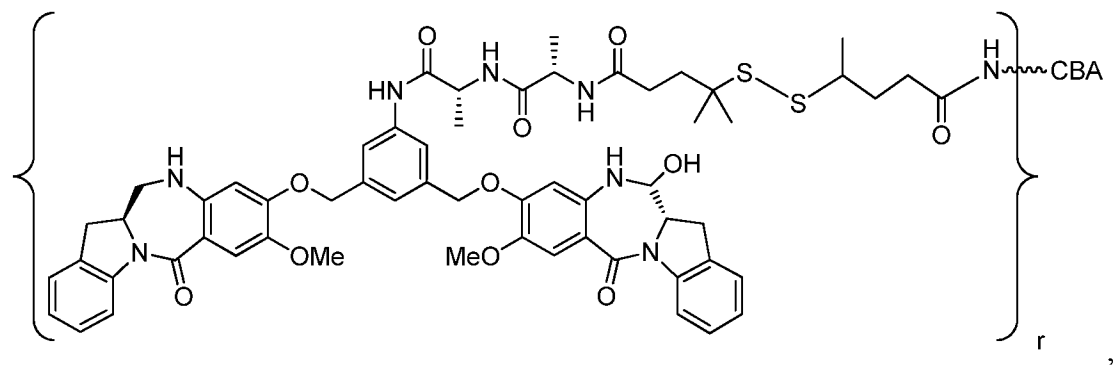
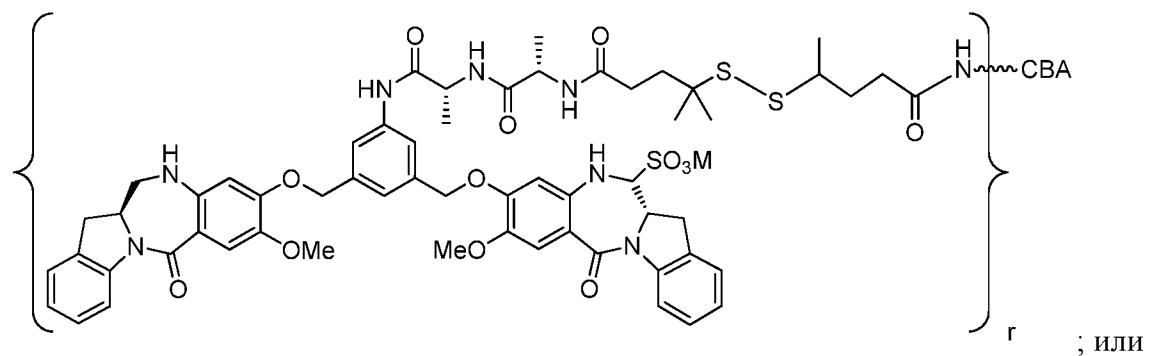








или



или его фармацевтически приемлемой соли, где:

r равен целому числу от 1 до 10;

Y представляет собой -H, -OH или -SO₃M; иM представляет собой фармацевтически приемлемый катион (напр., H⁺, Na⁺ или K⁺).

Более конкретно, Y является $-SO_3M$. Альтернативно Y является $-OH$.

[261] В некоторых вариантах реализации описанные здесь конъюгаты, такие как те, которые описаны во втором варианте реализации, или с 1-го по 15-й конкретных вариантов реализации, могут включать 1-10 цитотоксических соединений, 2-9 цитотоксических соединений, 3-8 цитотоксических соединений, 4-7 цитотоксических соединений или 5-6 цитотоксических соединений, при этом каждое цитотоксическое соединение включает соединительную группу, связывающую цитотоксическое соединение и СКА, и каждое цитотоксическое соединение в конъюгате одинаково.

[262] В любом из вариантов реализации конъюгатов, напр., согласно второму варианту реализации или с 1-го по 15-й конкретных вариантов реализации, связывающийся с клетками агент может связываться с целевыми клетками, выбранными из опухолевых клеток, зараженных вирусом клеток, зараженных микроорганизмом клеток, зараженных паразитом клеток, аутоиммунных клеток, активированных клеток, миелоидных клеток, активированных Т-клеток, В-клеток или меланоцитов; клеток, экспрессирующих антигены CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, ЕpCAM, CanAg, CALLA или Her-2; антигенов Her-3; или клеток, экспрессирующих рецептор инсулинового фактора роста, рецептор эпидермального фактора роста и фолатный рецептор.

[263] В любом из вариантов реализации конъюгатов, напр., согласно второму варианту реализации или с 1-го по 15-й конкретных вариантов реализации, связывающийся с клетками агент может являться антителом, одноцепочечным антителом, фрагментом антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом моноклонального антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, химерным антителом, фрагментом химерного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, доменным антителом, фрагментом доменного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, лимфокином, гормоном, витамином, фактором роста, колониестимулирующим фактором или молекулой транспорта питательных веществ.

[264] Антитело может являться антителом с измененной поверхностью, одноцепочечным антителом с измененной поверхностью или фрагментом антитела с измененной поверхностью.

[265] Антитело может являться моноклональным антителом, одноцепочечным

моноклональным антителом или фрагментом такого моноклонального антитела.

[266] Антитело может являться гуманизированным антителом, одноцепочечным гуманизированным антителом или фрагментом гуманизированного антитела.

[267] В любом из вышеуказанных вариантов реализации конъюгатов, например, согласно второму варианту осуществления или с 1-го по 15-й конкретные варианты осуществления, связывающийся с клетками агент может являться антителом против рецептора фолиевой кислоты или фрагментом такого антитела. Более конкретно антитело против рецептора фолиевой кислоты является антителом huMOV19.

[268] В качестве альтернативы, в любом из вышеуказанных вариантов реализации конъюгатов, например, согласно второму варианту реализации или с 1-го по 15-й конкретные варианты реализации, связывающийся с клетками агент может являться антителом против EGFR или фрагментом такого антитела. В одном варианте реализации антитело против EGFR является неантагонистическим антителом, включая, например, описанные в WO2012058592 антитела, включенные в настоящее описание посредством ссылки. В другом варианте реализации антитело против EGFR является нефункциональным антителом, *напр.*, гуманизированным ML66. Более конкретно антитело против EGFR является huML66.

[269] Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из конъюгатов, описанных здесь, и фармацевтически приемлемый носитель.

[270] Изобретение дополнительно предоставляет конъюгат, содержащий любое из рассматриваемых соединений, присоединенное к связывающемуся с клетками агенту.

[271] Изобретение также предоставляет способ угнетения аномального роста клеток или лечения пролиферативного расстройства, аутоиммунного расстройства, деструктивного поражения костей, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, фиброзного заболевания, нейродегенеративного заболевания, панкреатита или болезни почек у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества любого соединения (с или без какой-либо линкерной группы) или конъюгата согласно изобретению и необязательно второго химиотерапевтического вещества.

[272] В некоторых вариантах реализации изобретения второе химиотерапевтическое вещество вводят млекопитающему последовательно или непрерывно.

[273] В некоторых вариантах реализации изобретения способ предназначен для лечения

состояния, выбранного из группы, включающей: рак, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, реакцию "трансплантат-против-хозяина" (РТПХ), отторжение трансплантата, волчанку, миозит, инфекцию и иммунодефицит.

[274] В некоторых вариантах реализации изобретения способ или конъюгат предназначен для лечения рака.

[275] В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой опухоль системы крови или солидную опухоль. Более конкретно рак представляет собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, меланому, рак легкого (*напр.*, немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ)), рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак простаты, эндометриальный рак, лимфома (*напр.*, неходжкинская лимфома), миелодиспластический синдром (МДС), перитонеальный рак, или лейкоз (*напр.*, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый моноцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, эозинофильный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (*напр.*, В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ)).

ИЗГОТОВЛЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ "СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С КЛЕТКАМИ АГЕНТ - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"

[276] Чтобы присоединить цитотоксические соединения или их производное согласно настоящему изобретению к связывающемуся с клетками агенту, цитотоксическое соединение может включать соединительный фрагмент с присоединенной к нему реакционноспособной группой, например, соединение **14** (пример 1), **23** (пример 2), **35** (пример 3), **49** (пример 4), **80** (пример 5), **90** (пример 6), **63** (пример 7), или **70** (пример 8). Эти соединения могут быть непосредственно связаны со связывающимся с клетками агентом. Характерные процессы присоединения цитотоксических соединений, имеющих реакционноспособную группу, со связывающимся с клетками агентом с получением конъюгатов "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство" описаны в примерах 11, 13, 14-17, 19 и 20.

[277] В одном варианте реализации изобретения бифункциональный сшивающий реагент может сначала прореагировать с цитотоксическим соединением с получением соединения, несущего линкерный фрагмент, с одной присоединенной к нему реакционноспособной группой (*т.е.*, соединение лекарство-линкер), которое может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом. Альтернативно один конец бифункционального сшивающего реагента может сначала прореагировать со

связывающимся с клетками агентом с получением вещества, несущего линкерный фрагмент с одной реакционноспособной группой, которая может затем реагировать с цитотоксическим соединением. Линкерный фрагмент может содержать химическую связь, позволяющую высвобождение цитотоксического фрагмента в определенном месте. Подходящие химические связи хорошо известны в данной области техники и включают дисульфидные связи, тиоэфирные связи, кислотнo-лабильные связи, фотолабильные связи, пептидазо-лабильные связи и эстеразо-лабильные связи (см. *напр.* Патенты США 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 и 7414073). Предпочтительны дисульфидные связи, тиоэфирные и пептидазо-лабильные связи. Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают нерасщепляемые линкеры, такие как описанные в публикации патентной заявки США № 2005/0169933, или же заряженные или гидрофильные линкеры, описанные в документах US 2009/0274713, US 2010/01293140 и WO 2009/134976, каждая из которых положительным образом включена в настоящее описание посредством ссылки.

[278] В одном варианте реализации изобретения раствор связывающегося с клетками агента (*напр.*, антителя) в водном буфере можно инкубировать с молярным избытком бифункционального сшивающего агента, такого как *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноата (SPP), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) 2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB) для введения дитиопиридильных групп. Модифицированное связывающийся с клетками агент (*напр.*, модифицированное антитело) затем подвергают взаимодействию с тиолсодержащим цитотоксическим соединением, описанным в данном описании, таким как соединение **98** или **99** (примеры 9 и 10), с получением дисульфидно связанного конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство" согласно настоящему изобретению.

[279] В другом варианте реализации изобретения тиолсодержащее цитотоксическое соединение, описанное в данном описании, такое как соединение **98** или **99**, может вступать в реакцию с бифункциональным сшивающим агентом, таким как *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) 2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), с образованием соединения цитотоксический агент-линкер, которое может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом с получением дисульфидно связанного конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство" согласно настоящему изобретению. Соединение цитотоксический агент-линкер

может быть получено *in situ* без очистки перед реакцией со связывающимся с клетками агентом. Пример процесса описан в примерах 12 и 18. Альтернативно соединение цитотоксический агент-линкер может быть очищено перед реакцией со связывающимся с клетками агентом.

[280] Конъюгат "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство" может быть очищен с использованием любых методов очистки, известных в данной области, таких как описанные в патенте США № 7811572 и публикации США 2006/0182750, оба включены в настоящее описание посредством ссылки. Например, конъюгат "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство" может быть очищен с помощью тангенциальной проточной фильтрации, адсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, избирательного осаждения, неадсорбционной фильтрации или их комбинации. В предпочтительном варианте для очистки конъюгатов используются тангенциальная проточная фильтрация (ТПФ, также известна как фильтрование поперечного потока, ультрафильтрация и диафильтрация) и/или адсорбционные хроматографические смолы.

[281] В качестве альтернативы, связывающийся с клетками агент (*напр.*, антитело), можно инкубировать с молярным избытком модифицирующего антитело агента, такого как 2-иминотиолан, L-гомоцистеин тиолактон (или производные) или N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) для введения сульфгидрильных групп. Модифицированное антитело затем вступает в реакцию с соответствующим дисульфидсодержащим цитотоксическим агентом, с получением дисульфидно связанного конъюгата "антитело - цитотоксическое средство" Конъюгат "антитело - цитотоксическое средство" может затем быть очищен с помощью методов, описанных выше. Связывающийся с клетками агент может быть также сконструировано с тиольными фрагментами, *напр.* цистеин-спроектированные антитела, описанные в патентах США № 7772485 и 7855275.

[282] В другом варианте реализации изобретения раствор связывающегося с клетками агента (*напр.*, антитела) в водном буфере можно инкубировать с молярным избытком модифицирующего антитела агента, такого как N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК) для введения малеимидных групп, или N-сукцинимидил-4-(иодацетил)-аминобензоат (СИАБ) для введения иодацетильных групп. Модифицированное связывающийся с клетками агент (*напр.*, модифицированное антитело) затем подвергают взаимодействию с тиолсодержащим цитотоксическим соединением, с получением тиозфирно связанного конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство". Конъюгат может быть затем очищен с помощью

методов, описанных выше.

[283] Число цитотоксических молекул, связанных на молекуле антитела, можно определить спектрофотометрически, путем измерения отношения оптической плотности при 280 нм и 330 нм. В среднем с помощью способов, описанных в настоящем документе, могут быть связаны 1-10 цитотоксических соединений / молекулу (-ы) антитела. Предпочтительное среднее количество связанных цитотоксических соединений на молекулу антитела составляет 2-5, а наиболее предпочтительным является 2,5-4,0.

[284] Типичные способы получения конъюгатов "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство" согласно настоящему изобретению описаны в 8765740 и в публикации патентной заявки США № 2012/0238731. Вся информация в этих документах включена в данное описание посредством ссылки.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ И КОНЬЮГАТОВ

[285] Цитотоксические соединения и конъюгаты "связывающийся с клетками агент-лекарственное средство" согласно изобретению могут быть оценены по их способности подавлять пролиферацию различных линий раковых клеток *in vitro*. Например, для оценки цитотоксичности этих соединений и их конъюгатов могут быть использованы такие клеточные линии, как линия клеток рака шейки матки человека KB, линия клеток острого моноцитарного лейкоза человека ТНР-1, линия клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL60, линия клеток острого миелоидного лейкоза человека HNT-34. Оцениваемые клетки могут подвергаться воздействию соединений или конъюгатов в течение 1-5 дней, и выжившие фракции клеток измерены в прямых анализах известными способами. Затем значения IC₅₀ можно рассчитать по результатам анализов. Альтернативно или дополнительно в качестве одного из пособий по определению типов рака, которые могут быть чувствительными к лечению соединениями или конъюгатами согласно изобретению, можно использовать фильтр по *in vitro* чувствительности клеточных линий, такой как описанный Национальным Институтом Рака США (см. Voskoglu-Nomikos *et al.*, 2003, *Clinical Cancer Res.* 9: 42227-4239, включена посредством ссылки).

[286] Примеры эффективности *in vitro* и целевой специфичности конъюгатов антитело-цитотоксический агент согласно настоящему изобретению показаны на ФИГ. 2 и 4. Все конъюгаты являются чрезвычайно цитотоксическими по отношению к антиген-положительным раковым клеткам, с IC₅₀ в низком пиколярном диапазоне. Антиген-отрицательные линии клеток остаются жизнеспособными при воздействии тех же

конъюгатов.

[287] В одном примере была измерена эффективность *in vivo* конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство". Мышей с ТКИД, несущих опухолевые клетки NCI-H2110, обрабатывали конъюгатами huMov19-80 и huMov19-90 и наблюдали значительную регрессию опухоли при нескольких дозах, в то время как у необработанных мышей опухоли быстро росли (ФИГ. 6). Активность конъюгата huMov19-90 наблюдалась при дозах всего до 5 мкг /кг.

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

[288] Настоящее изобретение включает композицию (*напр.*, фармацевтическую композицию), содержащую описанные здесь новые бензодиазепиновые соединения (*напр.*, индолинобензодиазепин или оксазолидинобензодиазепин), их производные или их конъюгаты (и/или сольваты, гидраты и/или соли) и носитель (фармацевтически приемлемый носитель). Настоящее изобретение дополнительно охватывает композицию (*напр.*, фармацевтическую композицию), содержащую описанные здесь новые бензодиазепиновые соединения, их производные или их конъюгаты (и/или сольваты, гидраты и/или соли) и носитель (фармацевтически приемлемый носитель), и дополнительно второй терапевтический агент. Настоящие композиции пригодны для ингибирования неестественного роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего (*напр.*, человека). Настоящие композиции также пригодны для лечения депрессии, тревожности, стресса, фобий, паники, дисфории, психиатрических расстройств, боли и воспалительных заболеваний у млекопитающего (*напр.*, человека).

[289] Настоящее изобретение включает способ угнетения аномального роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего (*напр.*, человека), включающий введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества новых бензодиазепиновых соединений, описанных здесь, (*напр.*, индолинобензодиазепина или оксазолидинобензодиазепина), их производных, или их конъюгатов, (и/или сольватов и их солей) или их композиции, отдельно или в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[290] Настоящее изобретение также относится к способам лечения, включающим введение субъекту, нуждающемуся в лечении, эффективного количества любого из конъюгатов, описанных выше.

[291] Аналогичным образом настоящее изобретение относится к способу индукции

гибели клеток в выбранных клеточных популяциях, который включает контактирование клетки-мишени или ткани, содержащей клетки-мишени, с эффективным количеством цитотоксического средства, содержащего любое из цитотоксических соединений - связывающихся с клетками агентов (*напр.*, индолинобензодиазепинового или оксазолидинобензодиазепинового димера, присоединенного к связывающемуся с клетками агенту) согласно настоящему изобретению, его соль или его сольват. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми может связываться связывающийся с клетками агент.

[292] При желании вместе с конъюгатом могут быть введены другие активные агенты, такие как другие противоопухолевые средства.

[293] Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и наполнители хорошо известны и могут быть определены обычным специалистом в данной области техники на основании клинической ситуации.

[294] Примеры подходящих носителей, разбавителей и/или наполнителей включают: (1) фосфатный буферный раствор Дульбекко, рН около 7,4, содержащий или не содержащий около 1-25 мг/мл сывороточного альбумина человека, (2) 0,9% физиологического раствора (0,9 % масс./об. NaCl), и (3) 5% (масс./об.) раствора декстрозы; и могут также содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Tween 20.

[295] Способ индуцирования гибели клеток в выбранных клеточных популяциях может быть осуществлен на практике *in vitro*, *in vivo*, или *ex vivo*.

[296] Примеры использования *in vitro* включают обработку аутологичного костного мозга до его пересадки в того же пациента для того, чтобы убить больные или злокачественные клетки; обработку костного мозга до его трансплантации для того, чтобы убить компетентные Т-клетки и предотвратить болезнь "трансплантат против хозяина" (РТПХ); обработку клеточных культур для того, чтобы убить все клетки за исключением желаемых вариантов, которые не экспрессируют антиген-мишень; или же убить варианты, которые экспрессируют нежелательный антиген.

[297] Условия неклинического использования *in vitro* легко определяются обычным специалистом в данной области техники.

[298] Примерами клинического применения *ex vivo* являются: удаление опухолевых клеток или лимфоидных клеток из костного мозга перед аутологичной трансплантацией при лечении рака или при лечении аутоиммунных заболеваний, или для удаления Т-клеток и других лимфоидных клеток из аутогенного или аллогенного костного мозга или

ткани до пересадки в целях предотвращения РТПХ. Лечение может быть проведено следующим образом. Костный мозг отбирают из пациента или другого индивидуума, а затем инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавляется цитотоксический агент согласно изобретению в концентрации в диапазоне от около 10 мкМ до 1 пкМ, в течение от около 30 минут до около 48 часов при температуре около 37° С. Точные условия концентрации и времени инкубации, *т.е.* доза, легко определяются обычным специалистом в данной области техники. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту внутривенно в соответствии с известными способами. В тех случаях, когда пациент между временем забора костного мозга и реинфузии обработанных клеток получает другое лечение, такое как курс аблятивной химиотерапии или облучения всего тела, обработанные клетки костного мозга хранят в замороженном виде в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

[299] Для клинического применения *in vivo* цитотоксическое средство согласно настоящему изобретению будет поставляться в виде раствора или лиофилизированного порошка, которые проверены на стерильность и уровни эндотоксина. Примеры подходящих протоколов введения конъюгата представлены ниже. Конъюгаты вводят еженедельно в течение 4 недель как внутривенный болюс каждую неделю. Дозы болюса приведены в 50-1000 мл физиологического раствора, к которому могут быть добавлены 5-10 мл сывороточного альбумина человека. Дозировки будут составлять от 10 мкг до 2000 мг на одно введение, внутривенно (диапазон от 100 нг до 20 мг/кг в сутки). После четырех недель лечения пациент может продолжать получать лечение на еженедельной основе. Конкретные клинические протоколы в отношении способа введения, вспомогательных веществ, разбавителей, времени и *т.д.*, могут быть определены специалистом в данной области техники на основании клинической ситуации.

[300] Примеры патологий, которые можно лечить в соответствии с *in vivo* или *ex vivo* способами индуцирования гибели клеток в выбранных клеточных популяциях, включают злокачественность любого типа, включая, напр., рак, аутоиммунные заболевания, такие как системная волчанка, ревматоидный артрит и рассеянный склероз; отторжения трансплантатов, такие как отторжение почечного трансплантата, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата сердца, и отторжение трансплантата костного мозга; реакцию "трансплантат против хозяина"; вирусные инфекции, такие как ЦМВ-инфекция, ВИЧ-инфекция, СПИД и др.; и паразитарные инфекции, такие как лямблиоз, амебиаз, шистосомоз и другие, как их может

определить обычный специалист в данной области техники.

[301] Противораковые медикаменты и их дозировки, пути введения и рекомендуемое применение известны в данной области и описаны в такой литературе, как Настольный справочник врача (НСВ). НСВ описывает дозировки средств, которые были использованы при лечении различных видов рака. Схема применения и дозировки этих вышеуказанных химиотерапевтических лекарственных средств, которые являются терапевтически эффективными, будут зависеть от конкретного рака, подлежащего лечению, тяжести заболевания и других факторов, знакомых врачу-специалисту в данной области, и могут быть определены врачом. Содержимое НСВ специально включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Специалист в данной области может просмотреть НСВ, используя один или несколько из следующих параметров, для определения схемы применения и дозы химиотерапевтических средств и конъюгатов, которые могут быть использованы в соответствии с идеями настоящего изобретения. Эти параметры включают:

Подробный указатель

По производителю

Продукты (по названию компании или торговой марке-наименованию препарата)

Указатель по категориям

Указатель родовых/химических названий (общие названия препаратов, не являющиеся торговыми марками)

Цветные изображения препаратов

Информация о продукте, в соответствии с маркировкой FDA

Химическая информация

Функция/действие

Показания и противопоказания

Клинические исследования, побочные эффекты, предупреждения

АНАЛОГИ И ПРОИЗВОДНЫЕ

[302] Специалистам в области цитотоксических средств будет легко понять, что каждое из описанных здесь цитотоксических средств может быть модифицировано таким образом, что получаемое в результате соединение по-прежнему сохраняет специфичность и/или активность исходного соединения. Специалисту также ясно, что многие из этих

соединений могут быть использованы вместо цитотоксических средств, описанных в данном документе. Таким образом, цитотоксические средства согласно настоящему изобретению включают аналоги и производные соединений, описанных в настоящем документе.

[303] Все документы, ссылки на которые приведены в данном описании и в последующих примерах, специально включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

ПРИМЕРЫ

[304] Далее изобретение будет проиллюстрировано неограничивающими примерами. Если не указано иное, все проценты, соотношения, части *и т.д.* даны по массе. Все реагенты были приобретены у Aldrich Chemical Co., Нью-Джерси, или у других коммерческих источников. Спектры ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР) были получены на приборе Bruker 400 МГц. Масс-спектры получали на приборе Bruker Daltonics Esquire 3000, а ЖХМС (жидкостная хромато-масс-спектрометрия, LCMS) получали на Agilent 1260 Infinity LC с одноквадрупольным масс-спектрометром Agilent 6120 с использованием ионизации электрораспылением.

[305] Следующие растворители, реагенты, защитные группы, остатки и другие обозначения могут обозначаться своими аббревиатурами в скобках:

Me = метил; Et = этил; Pr = пропил; *i*-Pr = изопропил; Bu = бутил; *m*-Bu = трет-бутил; Ph = фенил и Ac = ацетил

AcOH или HOAc = уксусная кислота

ACN или CH_3CN = ацетонитрил

Ala = аланин

водн. = водный

$\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$ = комплекс боран-диметилсульфид

Bn = бензил

Бок или БОК = трет-бутоксикарбонил

CBr_4 = карбонтетрабромид

Cbz или Z = бензилоксикарбонил

ДХМ или CH_2Cl_2 = дихлорметан

ДХЭ = 1,2-дихлорэтан

ДМАП = 4-диметиламинопиридин

ДИ вода = деионизированная вода

ДИБАЛ = диизобутилалюминия гидрид

ДИЭА или ДИПЭА = N,N-диизопропилэтиламин

ДМА = N,N-диметилацетамид

ДМФА = N,N-диметилформаид

ДМСО = диметилсульфоксид

ДТТ = дитиотреитол

ЭДК = 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииимид

ЭЭДХ = N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин

ЭРИ или ЭР = ионизация электрораспылением

EtOAc = этилацетат

Gly = глицин

г = граммы

ч = час

ГАТУ = N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафосфат

ВЭЖХ = высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОБт или ГОБТ = 1-гидроксибензотриазол

АГЛ = алюмогидрид лития

ЖХ = жидкостная хроматография

ЖХМС = жидкостная хромато-масс-спектрометрия

мин = минуты

мг = миллиграммы

мл = миллилитры

ммоль = миллимоли

мкг = микрограммы

мкл = микролитры

мкмоль = микромоли

Me = метил

MeOH = метанол

MeI = метилйодид

МС = масс-спектрометрия

MsCl = метансульфонилхлорид (мезилхлорид)

Ms₂O = метансульфоновый ангидрид

NaBH(OAc)₃ = натрия триацетоксиборгидрид

NHS = N-гидроксисукцинамид

ЯМР = спектроскопия ядерного магнитного резонанса

PPh₃ = трифенилфосфин

ПТСХ = препаративная тонкослойная хроматография

рац. = рацемическая смесь

R_f = коэффициент удерживания

ОФВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ = обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

КТ или кт = комнатная температура (температура окружающей среды, около 25 °С)

насыщ. = насыщенный

НТАБ = натрия триацетоксиборгидрид (NaBH(OAc)₃)

TBSCl или TBDMSCl = *трет*-бутилдиметилсилилхлорид

TBS = *трет*-бутилдиметилсилил

ТКЭФ·НСl = *трис*(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид

ТЭА = триэтиламин (Et₃N)

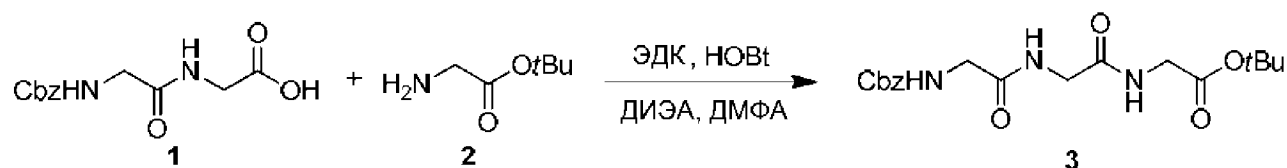
ТФУ = трифторуксусная кислота

ТГФ = тетрагидрофуран

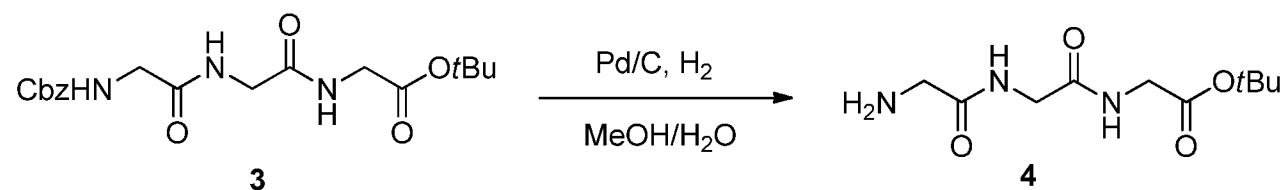
ТСХ = тонкослойная хроматография

Val = валин

Пример 1. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((2-((2-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноата (соединение **14**)

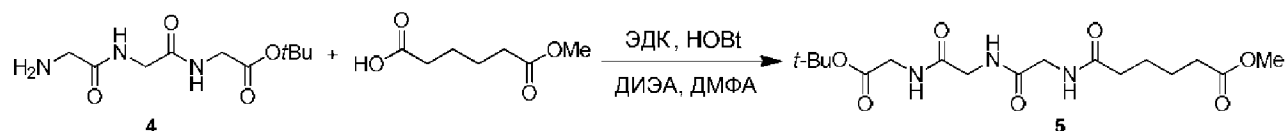


[306] **Стадия 1:** Z-Gly-Gly-OH соединение **1** (5,0 г, 18,78 ммоль) и H-Gly-Ot-Bu·HCl соединение **2** (3,46 г, 20,66 ммоль) растворяли в ДМФА (37,6 мл). ЭДК·HCl (3,96 г, 20,66 ммоль) и ГОБт (2,88 г, 18,78 ммоль) добавляли в реакционную колбу, с последующим добавлением ДИПЭА (8,18 мл, 46,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт в атмосфере Ag на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂, промывали насыщ. NH₄Cl, насыщ. NaHCO₃, затем водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0% - 5%) с получением чистого соединения **3** в виде белого твердого вещества (6,35 г, 89% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6): δ 8,18-8,13 (м, 2H), 7,48 (т, 1H, *J* = 6,0 Гц), 7,37-7,36 (м, 3H), 7,34-7,32 (м, 1H), 5,04 (с, 2H), 4,09 (к, 1H, *J* = 5,2 Гц), 3,74 (т, 4H, *J* = 6,1 Гц), 3,67 (д, 2H, *J* = 6,0 Гц), 3,17 (д, 2H, *J* = 5,2 Гц), 1,41 (с, 9H). ЖХМС = 4,28 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 324,15 (M-*t*-Bu+H).

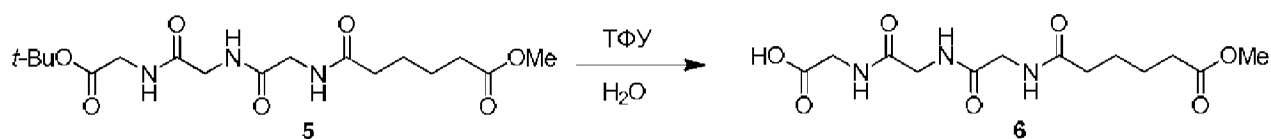


[307] **Стадия 2:** Соединение **3** (6,3 г, 16,60 ммоль) растворяли в MeOH (52,7 мл) и воде (2,64 мл). Реакционную смесь продували Ag и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (влажный, 10%) (0,884 г, 0,830 ммоль). Затем барботировали H₂ из баллона на протяжении 1 мин. Реакционную смесь перемешивали в токе H₂ из баллона при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит,

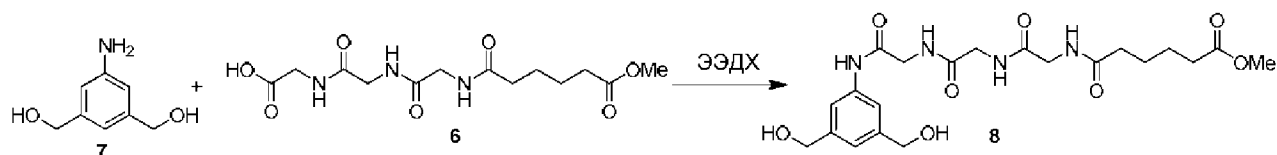
фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. К остатку добавляли CH₃CN (20 мл) и концентрировали. Операцию повторяли еще 2 раза с получением липкого твердого вещества. Остаток суспендировали в EtOAc/гексанах (2:1, 50 мл) и фильтровали и промывали EtOAc/гексанами (1:1, 30 мл). Твердое вещество сушили под вакуумом/N₂ на протяжении 1 ч с получением соединения **4** в виде белого твердого вещества (3,66 г, 90% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,21-8,18 (м, 1H), 8,12 (шс, 1H), 3,76 (шс, 2H), 3,73 (д, 2H, *J* = 6,0 Гц), 3,13 (с, 2H), 1,93 (шс, 2H), 1,41 (с, 9H).



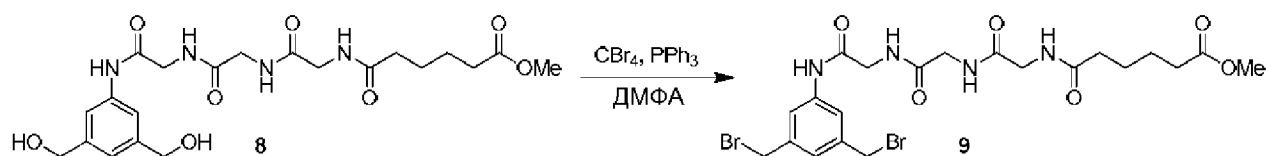
[308] **Стадия 3:** Аминное соединение **4** (1,0 г, 4,08 ммоль) и монометиладипат (664 мкл, 4,48 ммоль) растворяли в ДМФА (13,59 мл). ЭДК·НСl (860 мг, 4,48 ммоль) и ГОБт (624 мг, 4,08 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (1,424 мл, 8,15 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (20 мл, 5:1) и промывали насыщ. NH₄Cl, насыщ. NaHCO₃, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (градиент, 0%-20% MeOH/ДХМ) с получением чистого соединения **5** в виде белого твердого вещества (1,5 г, 95% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,17-8,06 (м, 3H), 3,74-3,71 (м, 6H), 3,59 (с, 3H), 2,32 (шт, 2H, *J* = 6,9 Гц), 2,14 (шт, 2H, *J* = 6,7 Гц), 1,52-1,49 (м, 4H), 1,41 (с, 9H).



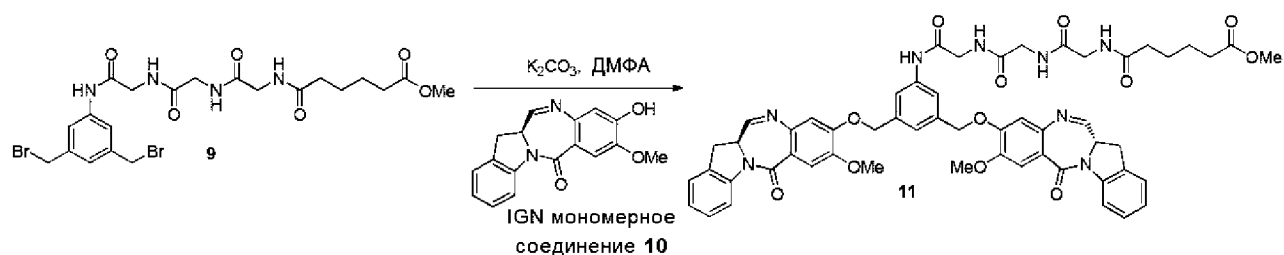
[309] **Стадия 4:** Соединение **5** (1,5 г, 3,87 ммоль) перемешивали в ТФУ (5,97 мл, 77,0 ммоль) и деионизированной воде (300 мкл) при кт на протяжении ночи. CH₃CN (10 мл) добавляли в реакционную смесь и перемешивали на протяжении 5 мин. Смесь стала густой с большим количеством белого осадка. Добавляли больше CH₃CN (30 мл) и еще перемешивали на протяжении 5 мин. Смесь фильтровали и сушили под вакуумом/N₂ на протяжении 1 ч с получением чистого соединения **6** в виде белого твердого вещества (0,7 г, 55% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 12,56 (с, 1H), 8,16-8,06 (м, 3H), 3,73 (дт, 6H, *J* = 8,6, 6,1 Гц), 3,59 (с, 3H), 2,32-2,29 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H), 1,51 (шт, 4H, *J* = 3,5 Гц).



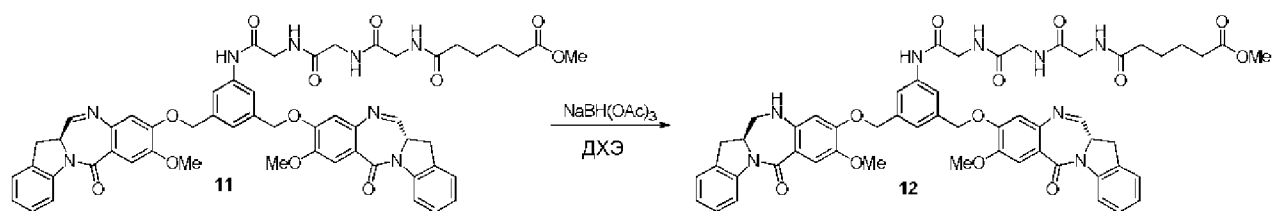
[310] **Стадия 5:** Анилиновое соединение **7** (100 мг, 0,653 ммоль) и кислотное соединение **6** (227 мг, 0,685 ммоль) суспендировали в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4,35 мл/2,2 мл) при кт. Добавляли ЭЭДХ (323 мг, 1,306 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали, остаток суспендировали в EtOAc (15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали EtOAc (2 x 15 мл) и сушили под вакуумом/ N_2 с получением соединения **8** в виде белого твердого вещества (260 мг, 85% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9,74 (с, 1H), 8,21-8,19 (м, 2H), 8,11-8,08 (м, 1H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, $J = 5,7$ Гц), 4,45 (д, 4H, $J = 5,6$ Гц), 3,87 (д, 2H, $J = 5,8$ Гц), 3,75 (дд, 4H, $J = 5,7, 13,4$ Гц), 3,58 (с, 3H), 2,31-2,27 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H), 1,52-1,48 (м, 4H). ЖХМС = 0,886 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 489,3 ($\text{M}+\text{Na}$).



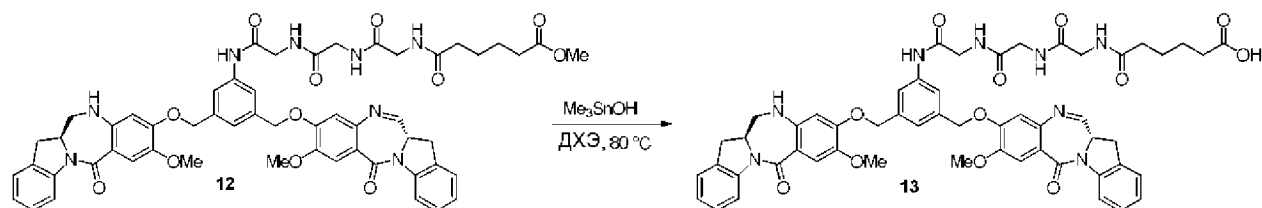
Стадия 6: Диольное соединение **8** (260 мг, 0,557 ммоль) и карбонтетрабромид (555 мг, 1,672 ммоль) растворяли в ДМФА (5,57 мл). Добавляли трифенилфосфин (439 мг, 1,672 ммоль) и перемешивали коричневую смесь под Ag при кт на протяжении 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/ MeOH (10:1, 30 мл) и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле ($\text{MeOH}/\text{ДХМ}$, 0%-10%, градиент) с получением соединения **9** в виде желтого твердого вещества. Продукт суспендировали в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (1:10, 30 мл) и затем фильтровали. Твердое вещество промывали EtOAc и сушили под вакуумом/ N_2 с получением чистого соединения **9** в виде почти белого твердого вещества (170 мг, 52% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9,95 (с, 1H), 8,25-8,20 (м, 2H), 8,12-8,10 (м, 1H), 7,65 (с, 2H), 7,22 (с, 1H), 4,68 (с, 3H), 3,89 (д, 2H, $J = 5,8$ Гц), 3,77 (дд, 4H, $J = 5,7, 7,4$ Гц), 3,58 (с, 3H), 2,31-2,27 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H), 1,51-1,49 (м, 4H). ЖХМС = 3,335 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 593,2 ($\text{M}+\text{H}$).



Стадия 7: Дибромидное соединение **9** (109 мг, 0,184 ммоль) и IGN мономерное соединение **10** (119 мг, 0,405 ммоль) растворяли в ДМФА (1,84 мл). Добавляли карбонат калия (63,6 мг, 0,460 ммоль) и перемешивали при кт на протяжении ночи. Воду (20 мл) добавляли в реакционную смесь для осаждения продукта. Суспензию перемешивали при кт на протяжении 5 мин и затем фильтровали и сушили под вакуумом/ N_2 на протяжении 1 ч. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, градиент, 0%-5%) с получением соединения **11** в виде желтого твердого вещества (160 мг, 60% выход, 70% чистота). ЖХМС = 5,240 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 1019,7 (M+H).

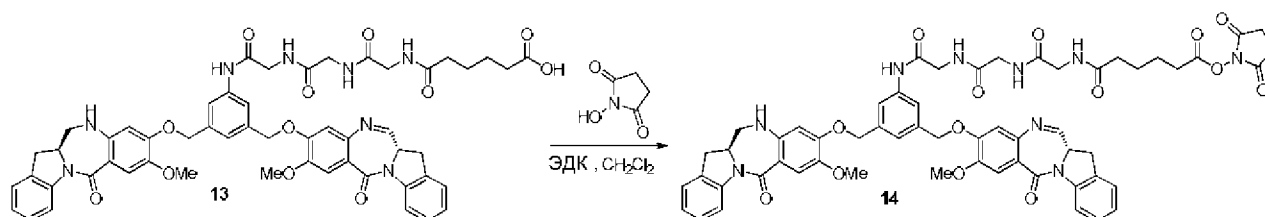


[311] **Стадия 8:** Дииминное соединение **11** (140 мг, 0,11 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтане (1,1 мл). Добавляли $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (23,29 мг, 0,11 ммоль) в реакционную смесь и перемешивали при кт на протяжении 1 ч. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 (30 мл) и гасили насыщ. водн. NH_4Cl раствором (15 мл). Слои разделяли и промывали соляным раствором, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, градиент, 35%-55%) с получением моноиминного соединения **12** в виде белого пушистого твердого вещества (33 мг, 29% выход), и также извлекли исходное соединение **11** (25 мг). ЖХМС = 7,091 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 1021,7 (M+H).



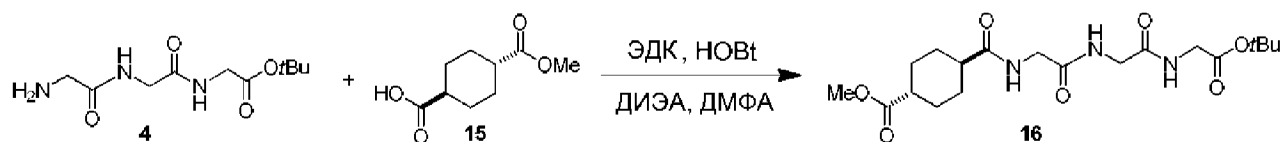
[312] **Стадия 9:** Метилэфирное соединение **12** (33 мг, 0,029 ммоль) растворяли в ТГФ

(1,09 мл) и воде (364 мкл). Добавляли LiOH (6,97 мг, 0,291 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении 1,5 ч. Реакционную смесь разбавляли H₂O (5 мл) и подкисляли 0,5 М водн. HCl до pH~4. Водный слой экстрагировали CH₂Cl₂/MeOH (3:1, 3 x 20 мл). Комбинированные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного соединения **13** в виде желтого твердого вещества (29 мг, 99% выход). ЖХМС = 5,356 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1007,7 (M+H).

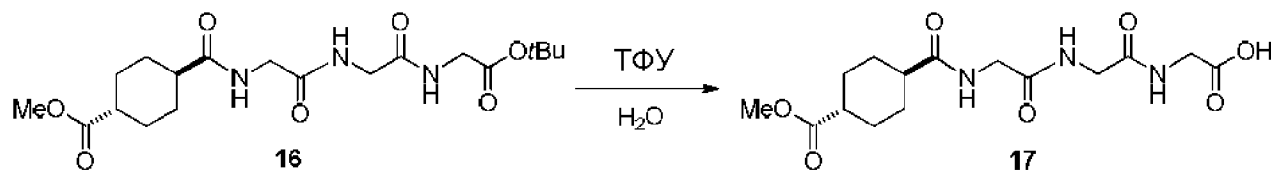


Стадия 10: ЭДК·HCl (22,08 мг, 0,115 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору кислотного соединения **13** (29 мг, 0,023 ммоль) и N-гидроксисукциамида (21,21 мг, 0,184 ммоль) в CH₂Cl₂ (2,3 мл) при кт. Реакционную смесь перемешивали на протяжении 2 часов. Реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂ и промывали водой (1 x 15 мл) и соляным раствором (1 x 15 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, CH₃CN/H₂O, градиент, 35%-55%). Содержащие продукт фракции комбинировали и лиофилизировали с получением 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((2-((2-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноата, соединения **14**, в виде белого пушистого твердого вещества (8 мг, 31% выход). ЖХМС = 5,867 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1104,7 (M+H).

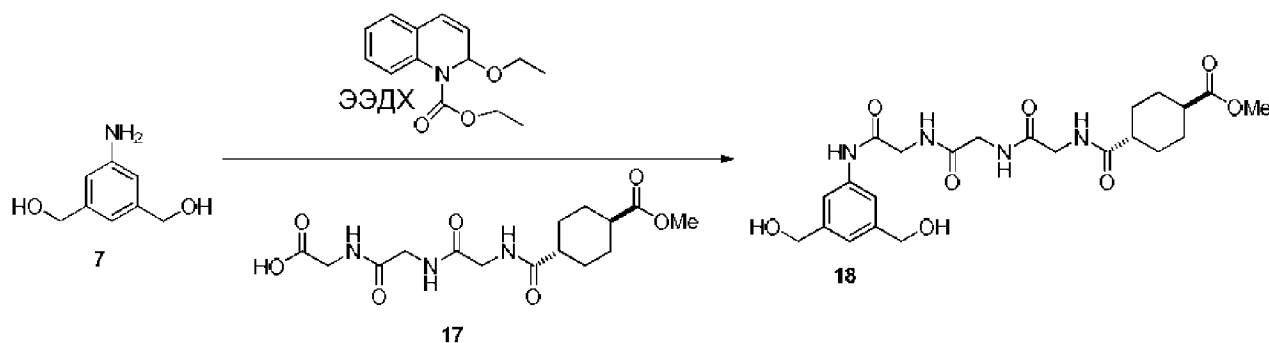
Пример 2. Синтез (1г,4г)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 4-((2-((2-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамоил)циклогексан-карбоксилата (соединение **23**)



[313] **Стадия 1:** Аминное соединение **4** (200 мг, 0,815 ммоль) и 1,4-*транс*-циклогександикарбоксильной кислоты метилэфирное соединение **15** (182 мг, 0,978 ммоль) растворяли в ДМФА (2,72 мл). ЭДК·НСl (188 мг, 0,978 ммоль) и ГОБТ (125 мг, 0,815 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (285 мкл, 1,631 ммоль). Смесь перемешивали при кт всю ночь. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали насыщ. NH_4Cl , насыщ. NaHCO_3 , соляным раствором и водой. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали до липкого остатка. CH_3CN (15 мл) добавляли к остатку и концентрировали. Операцию повторяли еще 2 раза с получением соединения **16** в виде сухого белого порошка (300 мг, 85% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8,16 (т, 1H, $J = 5,9$ Гц), 8,04 (дт, 2H, $J = 5,6, 14,8$ Гц), 3,74-3,69 (м, 6H), 3,59 (с, 3H), 2,31-2,25 (м, 1H), 2,20-2,13 (м, 1H), 1,94-1,91 (м, 2H), 1,82-1,79 (м, 2H), 1,41 (с, 9H), 1,34 (д, 3H, $J = 11,7$ Гц).

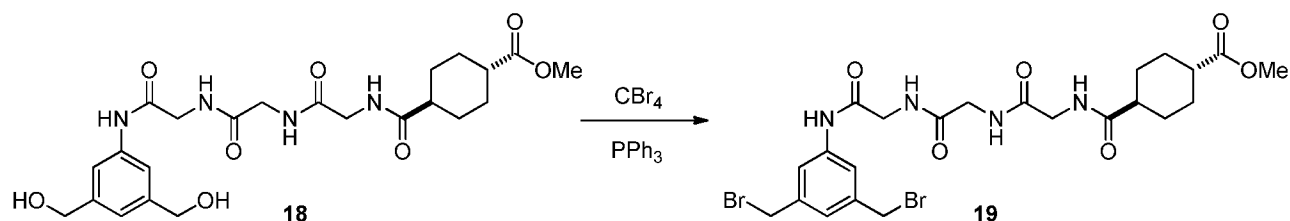


[314] **Стадия 2:** ТФУ (1,40 мл, 18,14 ммоль) и ДИ воду (67,8 мкл) добавляли к неразбавленному соединению **16** (300 мг, 0,726 ммоль) при кт и перемешивали на протяжении 3 ч. CH_3CN (20 мл) добавляли в реакционную смесь и концентрировали. Операцию повторяли еще 2 раза с получением соединения **17** в виде белого твердого вещества (230 мг, 89% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8,16-8,13 (м, 1H), 8,07-8,01 (м, 2H), 3,76-3,73 (м, 4H), 3,70 (шд, 2H, $J = 5,1$ Гц), 3,59 (с, 3H), 2,31-2,25 (м, 1H), 2,19-2,14 (м, 1H), 1,94-1,91 (м, 2H), 1,82-1,79 (м, 2H), 1,42-1,26 (м, 4H).

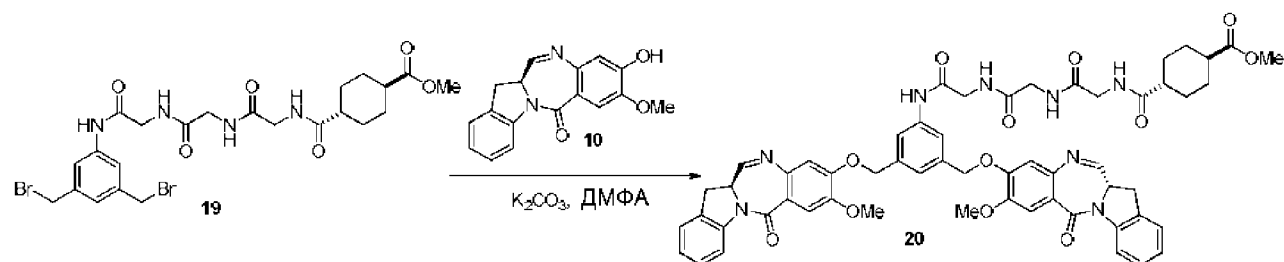


[315] **Стадия 3:** Анилиновое соединение **7** (135 мг, 0,881 ммоль) и кислотное соединение

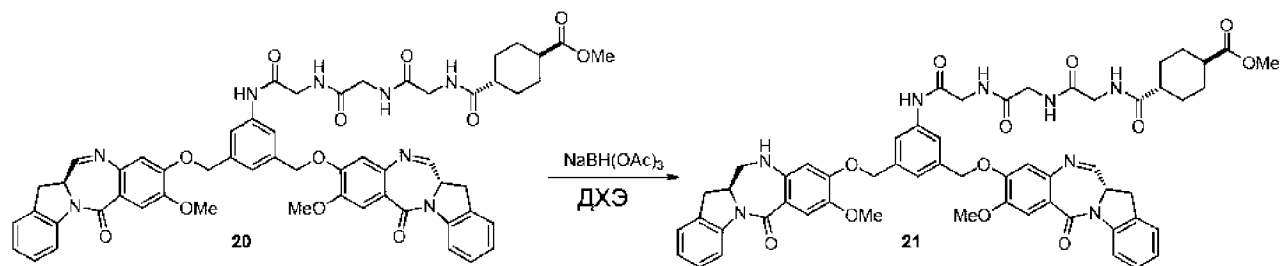
17 (331 мг, 0,925 ммоль) суспендировали в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2,9 мл/1,5 мл) при кт. Добавляли ЭДХ (436 мг, 1,763 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали, остаток суспендировали в EtOAc (15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали EtOAc (2 x 15 мл) и сушили под вакуумом/ N_2 с получением соединения **18** в виде белого твердого вещества (330 мг, 61% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMCO-}d_6$): δ 9,73 (с, 1H), 8,18 (дт, 2H, $J = 6,0, 19,2$ Гц), 8,09-8,01 (м, 2H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, $J = 5,7$ Гц), 4,45 (д, 4H, $J = 5,6$ Гц), 3,88-3,84 (м, 3H), 3,77-3,69 (м, 8H), 3,63 (с, 2H), 3,59 (с, 6H), 2,30-2,22 (м, 2H), 2,19-2,13 (м, 2H), 1,94-1,90 (м, 4H), 1,82-1,78 (м, 4H), 1,41-1,26 (м, 8H).



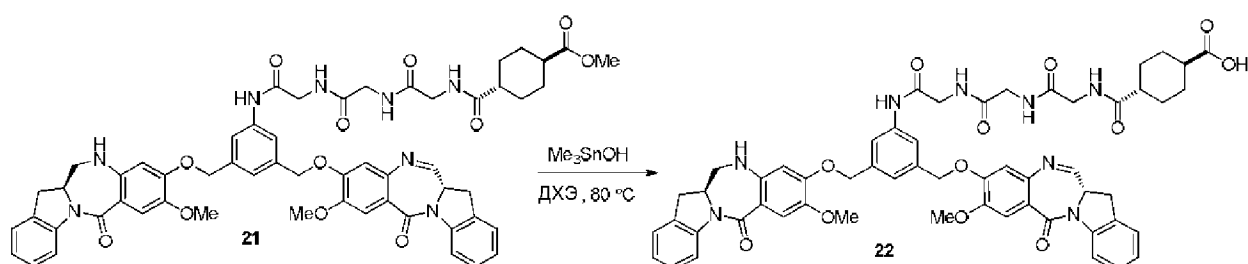
[316] **Стадия 4:** Соединение **18** (330 мг, 0,536 ммоль) и CBr_4 (533 мг, 1,608 ммоль) растворяли в ДМФА (5,36 мл). PPh_3 (422 мг, 1,608 ммоль) добавляли в реакционную смесь, при этом реакция окрасилась в желтый цвет с легким экзотермическим эффектом. Реакционную смесь перемешивали под Ag на протяжении 4 часов. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, градиент, 0%-10%) с получением соединения **19** в виде белого твердого вещества (234 мг, 64% выход). ЖХМС = 4,453 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 617,10 (M+H).



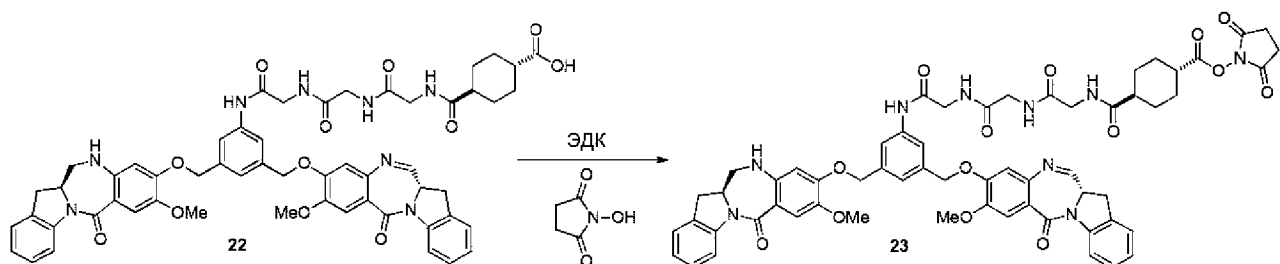
[317] **Стадия 5:** Соединение **20** получали так же, как и соединение **11** в Примере 1. Соединение **20** было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (264 мг, 60% выход). ЖХМС = 4,831 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 1045,20 (M+H).



[318] **Стадия 6:** Соединение **21** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Соединение **21** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (51 мг, 31% выход). ЖХМС = 5,127 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1047,30 (M+H).



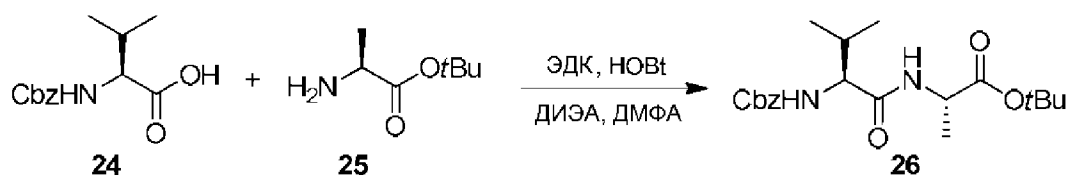
[319] **Стадия 7:** Метилэфирное соединение **21** (48 мг, 0,046 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтане (3,06 мл). Триметилстаннанол (124 мг, 0,688 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80 °С на протяжении ночи. Реакционную смесь охлаждали до кт и разбавляли водой (15 мл). Водный слой подкисляли до pH ~ 4 1 М HCl. Смесь экстрагировали CH₂Cl₂/MeOH (10:1, 3 x 20 мл). Комбинированные органические слои промывали соляным раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный остаток пробивали через короткую пластинку силикагеля и смывали CH₂Cl₂/MeOH (10:1, затем 5:1, 2 x 30 мл) и концентрировали. Кислотное соединение **22** было получено в виде желтого твердого вещества и использовалось в следующей стадии без дальнейшей очистки (48 мг, 100% выход). ЖХМС = 5,338 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1033,7 (M+H).



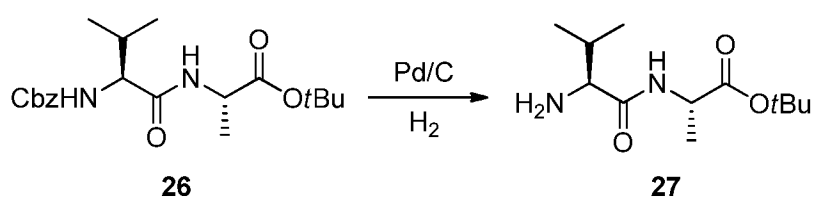
[320] **Стадия 8:** Соединение **23** получали так же, как и соединение **13** в Примере 1. (1r,4r)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 4-((2-((2-((2-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-

тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамоил)циклогексанкарбоксилат, соединение **23**, было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (8 мг, 19% выход). ЖХМС = 6,007 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1130,8 (M+H).

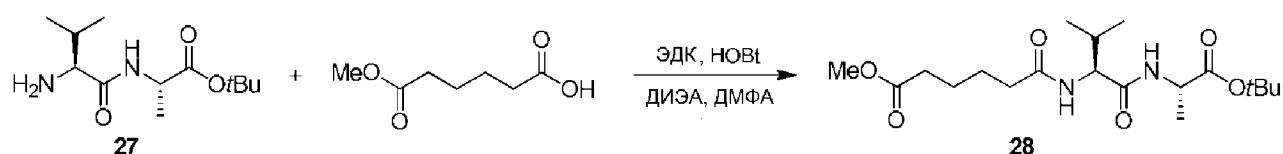
Пример 3. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((((S)-1-((((S)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12, 12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-6-оксогексаноата (соединение **35**)



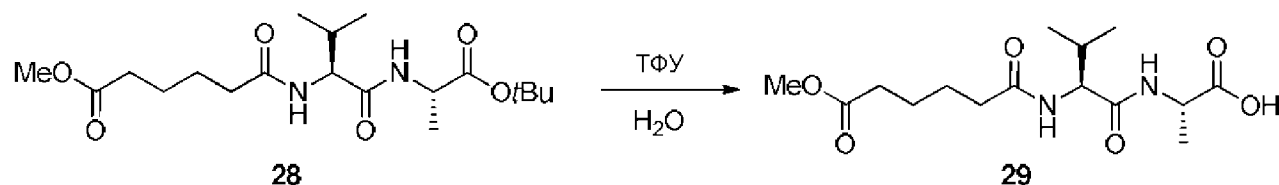
[321] **Стадия 1:** Z-Val-ОН соединение **24** (3,0 г, 11,94 ммоль) и L-Ala-*Ot*Bu соединение **25** (1,907 г, 13,13 ммоль) растворяли в ДМФА (23,88 мл). ЭДК·НСl (2,52 г, 13,13 ммоль) и ГОБТ (2,011 г, 13,13 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (4,59 мл, 26,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт под Аг на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли СH₂Сl₂ и промывали насыщ. NaНСО₃, насыщ. NH₄Сl, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtОAc/гексаны, градиент, 0%-50%) с получением соединения **26** в виде белого твердого вещества (3,68 г, 81% выход). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,39-7,29 (м, 5H), 6,29 (шд, 1H, *J* = 6,9 Гц), 5,34 (шд, 1H, *J* = 8,4 Гц), 5,11 (с, 2H), 4,45 (п, 1H, *J* = 7,2 Гц), 4,02-3,98 (м, 1H), 2,18-2,09 (м, 1H), 1,56 (с, 9H), 1,37 (д, 3H, *J* = 7,0 Гц), 0,98 (д, 3H, *J* = 6,8 Гц), 0,93 (д, 3H, *J* = 6,8 Гц). ЖХМС = 5,571 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 323,25 (M-*t*Bu+H).



[322] **Стадия 2:** Соединение **26** (3,68 г, 9,72 ммоль) растворяли в MeOH (30,9 мл) и воде (1,543 мл). Раствор продували Ag и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (10%, влажный, 0,517 г) в реакционную смесь. Затем на минуту барботировали H₂. Барботирование не прерывали и реакционную смесь перемешивали в токе H₂ из баллона при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит, фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали с получением соединения **27** в виде белого твердого вещества (2,35 г, 99% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,79-7,77 (м, 1H), 4,50 (п, 1H, *J* = 7,3 Гц), 3,27 (д, 1H, *J* = 3,9 Гц), 2,34-2,26 (м, 1H), 1,49 (с, 9H), 1,40 (д, 3H, *J* = 7,1 Гц), 1,01 (д, 3H, *J* = 7,0 Гц), 0,86 (д, 3H, *J* = 6,9 Гц).

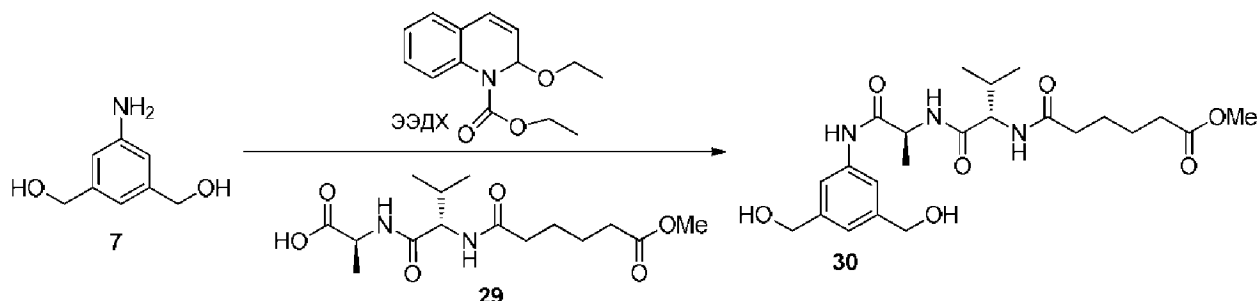


[323] **Стадия 3:** Аминное соединение **27** (2,35 г, 9,62 ммоль) и монометиладипат (1,69 г, 10,58 ммоль) растворяли в ДМФА (32,1 мл). ЭДК·НСl (1,94 г, 10,10 ммоль) и ГОБт (1,47 г, 9,62 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (3,36 мл, 19,24 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (20 мл, 5:1) и промывали насыщ. NH₄Cl, насыщ. NaHCO₃, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0%-50%) с получением соединения **28** в виде белого твердого вещества (2,77 г, 75% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6,29 (д, 1H, *J* = 7,2 Гц), 6,12 (д, 1H, *J* = 8,6 Гц), 4,43 (п, 1H, *J* = 7,2 Гц), 4,27 (дд, 1H, *J* = 6,4, 8,6 Гц), 3,66 (с, 3H), 2,35-2,31 (м, 2H), 2,26-2,23 (м, 2H), 2,12-2,03 (м, 1H), 1,70-1,63 (м, 4H), 1,46 (с, 9H), 1,36 (д, 3H, *J* = 7,1 Гц), 0,95 (очевидный т, 6H, *J* = 6,6 Гц).

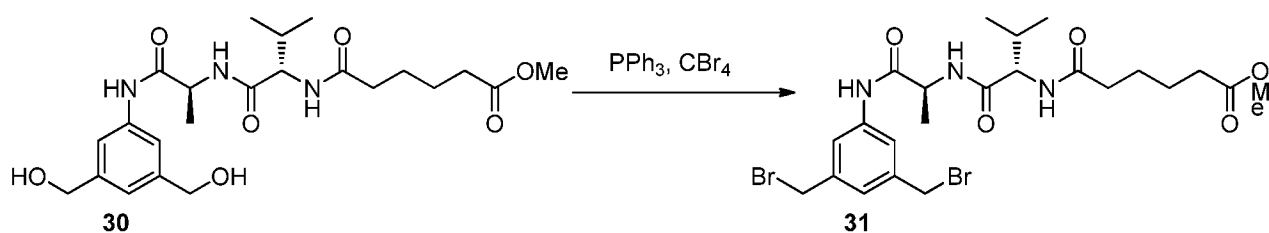


[324] **Стадия 4:** ТФУ (8,28 мл, 108,0 ммоль) и воду (0,56 мл) добавляли к неразбавленному соединению **28** (2,77 г, 7,17 ммоль) при кт и перемешивали на протяжении 2,5 ч. CH₃CN (30 мл) добавляли в реакционную смесь и концентрировали. Операцию повторяли 2 раза с получением соединения **29** в виде бледно-желтого твердого

вещества (2,0 г, 84% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,11 (шс, 1H), 7,29 (д, 1H, $J = 8,9$ Гц), 7,14 (д, 1H, 6,8 Гц), 4,58 (п, 1H, $J = 7,1$ Гц), 4,37 (т, 1H, $J = 8,7$ Гц), 3,68 (с, 3H), 2,37-2,32 (м, 4H), 2,03-1,99 (м, 2H), 1,69-1,63 (м, 4H), 1,49 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 0,97 (д, 3H, $J = 4,8$ Гц), 0,96 (д, 3H, $J = 4,8$ Гц).

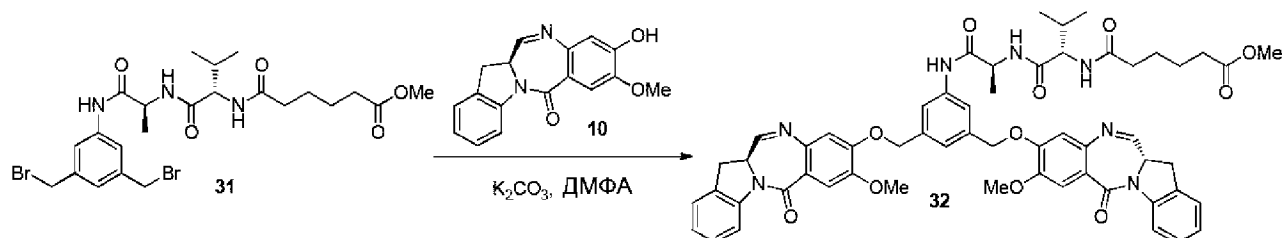


[325] **Стадия 5:** Анилиновое соединение **7** (150 мг, 0,98 ммоль) и кислотное соединение **29** (340 мг, 1,03 ммоль) суспендировали в $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (3,26 мл, 1,62 мл) при кт. Добавляли ЭДХ (484 мг, 1,96 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали и остаток суспендировали в $\text{EtOAc}/\text{Et}_2\text{O}$ (15 мл, 15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали Et_2O (2 x 15 мл) и сушили под вакуумом/ N_2 с получением соединения **30** в виде белого твердого вещества (150 мг, 33% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,61 (с, 2H), 7,47 (д, 1H, $J = 7,1$ Гц), 7,14 (с, 1H), 6,64 (д, 1H, $J = 8,0$ Гц), 4,82-4,75 (м, 1H), 4,45-4,40 (м, 4H), 3,64 (с, 3H), 2,36-2,27 (м, 4H), 2,16-2,07 (м, 1H), 1,68-1,59 (м, 4H), 1,47 (д, 3H, $J = 7,0$ Гц), 0,98 (д, 3H, $J = 3,6$ Гц), 0,95 (д, 3H, $J = 4,8$ Гц). ЖХМС = 3,073 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 466,25 (M+H).

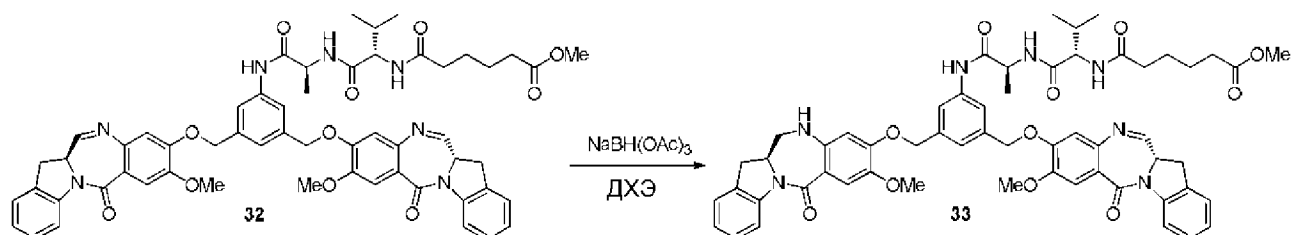


[326] **Стадия 6:** Диольное соединение **30** (150 мг, 0,322 ммоль) и CBr_4 (321 мг, 0,967 ммоль) растворяли в ДМФА (3222 мкл). PPh_3 (254 мг, 0,967 ммоль) добавляли в реакционную смесь, при этом реакция окрасилась в красновато-розовый цвет с легким экзотермическим эффектом. Реакционную смесь перемешивали под Ag на протяжении 4 часов. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле ($\text{EtOAc}/\text{гексаны}$, градиент, 0%-100%) с

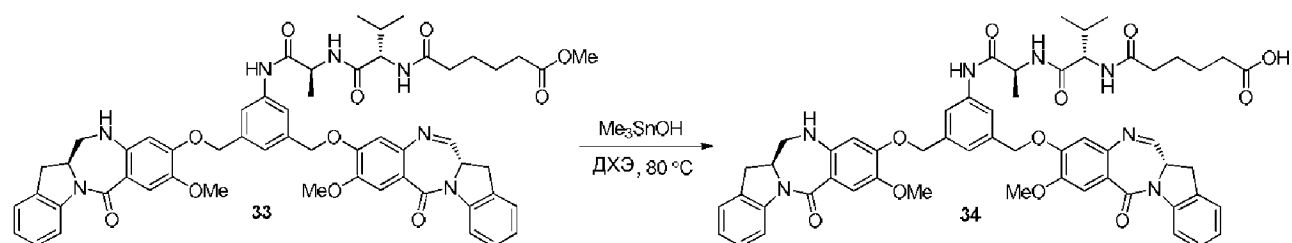
получением соединения **31** в виде почти белого твердого вещества (473 мг, 75% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6): δ 8,19 (д, 1H, $J = 6,6$ Гц), 7,85 (д, 1H, $J = 8,5$ Гц), 7,64 (с, 2H), 7,21 (с, 1H), 4,68 (с, 3H), 4,37 (п, 1H, $J = 7,0$ Гц), 4,18 (дд, 1H, $J = 7,2, 8,4$ Гц), 3,58 (с, 3H), 2,32-2,29 (м, 2H), 2,33-2,12 (м, 2H), 2,01-1,91 (м, 1H), 1,53-1,49 (м, 4H), 1,31 (д, 3H, $J = 7,1$ Гц), 0,89 (д, 3H, $J = 6,8$ Гц), 0,85 (д, 3H, $J = 6,8$ Гц). ЖХМС = 5,259 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 592,05 (M+H).



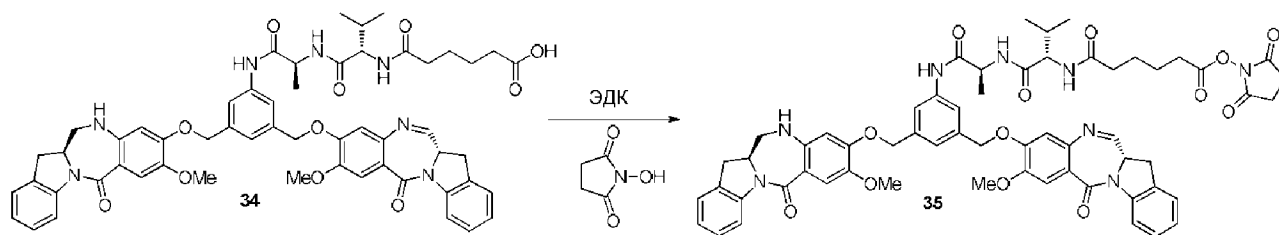
[327] **Стадия 7:** Соединение **32** получали так же, как и соединение **11** в Примере 1. Соединение **32** было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (162 мг, 57% выход, 70% чистота). ЖХМС = 6,461 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1018,7 (M+H).



[328] **Стадия 8:** Соединение **33** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Соединение **33** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (40 мг, 31% выход). ЖХМС = 5,528 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1020,30 (M+H).

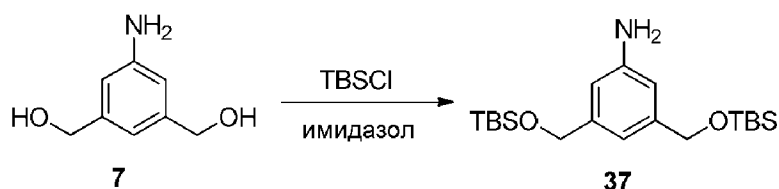


[329] **Стадия 9:** Соединение **34** получали так же, как и соединение **22** в Примере 2. Соединение **34** было получено в виде желтого твердого вещества после очистки с силикагелем (38 мг, 100% выход). ЖХМС = 5,211 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1006,35 (M+H).

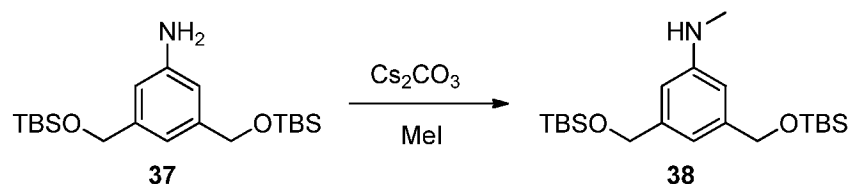


[330] **Стадия 10:** Соединение **35** получали так же, как и соединение **14** в Примере 1. 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-(3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12, 12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксoproпан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксobутан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение **35** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (8 мг, 20% выход). ЖХМС = 7,031 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1103,7 (M+H).

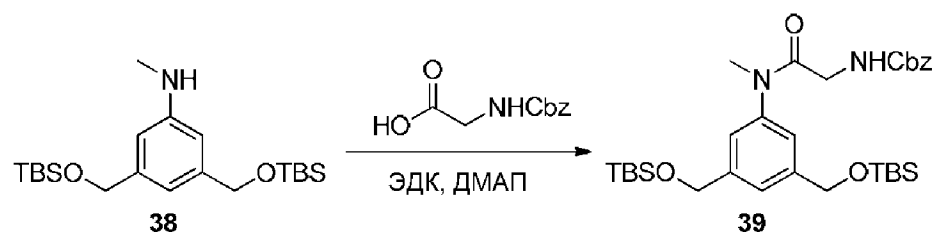
Пример 4. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 2-(3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-3,6,9,12-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазагептадекан-17-оата (соединение **49**)



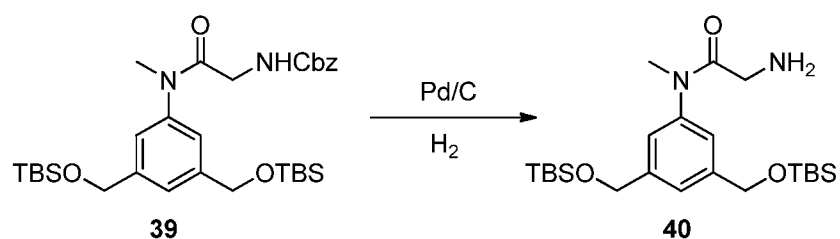
[331] **Стадия 1:** (5-амино-1,3-фенилен)диметанол соединение **7** (5,0 г, 32,6 ммоль) растворяли в ТГФ (65,3 мл). TBSCl (12,30 г, 82 ммоль) и имидазол (6,67 г, 98 ммоль) добавляли и перемешивали при кт на протяжении ночи под Аг. Реакционную смесь разводили EtOAc и промывали насыщ. NH₄Cl и соляным раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0%-30%) с получением соединения **37** в виде желтого масла (13 г, 100% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6,71 (с, 1H), 6,60 (с, 2H), 4,65 (с, 4H), 0,94 (с, 18 H), 0,10 (с, 12 H).



[332] **Стадия 2:** Cs₂CO₃ (8,54 г, 26,2 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору анилинового соединения **37** (10 г, 26,2 ммоль) в ДМФА (52,4 мл). Добавляли метилиодид (1,474 мл, 23,58 ммоль), реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении 3 ч. Воду (10 мл) и EtOAc (30 мл) добавляли в реакционную смесь. Слои отделяли и экстрагировали EtOAc (2x). Органические слои промывали водой (4x), высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0%-10%) с получением желаемого моно-метилованного продукта соединения **38** (3,8 г, 37% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6,63 (с, 1H), 6,52 (с, 2H), 4,67 (с, 4H), 2,84 (с, 3H), 0,94 (с, 18H), 0,10 (с, 12H).

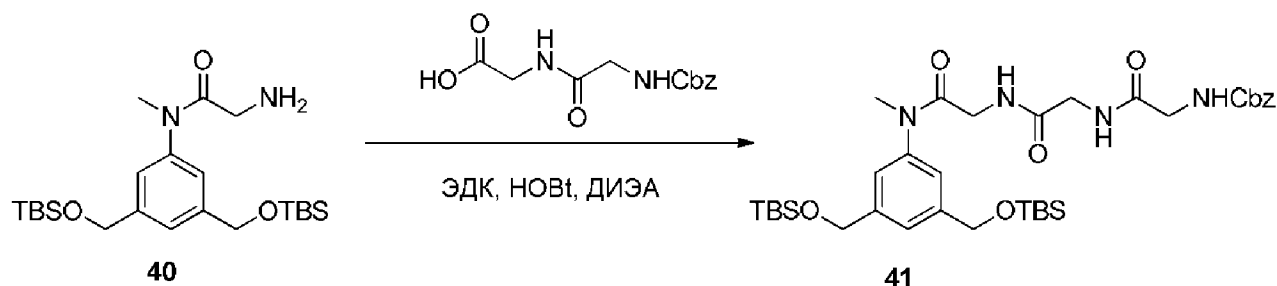


[333] **Стадия 3:** Анилиновое соединение **38** (1,0 г, 2,53 ммоль) и Z-Gly-OH (0,582 г, 2,78 ммоль) растворяли в ДМФА (8,42 мл). ЭДК·HCl (1,21 г, 6,32 ммоль) и ДМАП (340 мг, 2,78 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80 °С на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщ. NaHCO₃ и водой(2x), высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0%-30%-100%) с получением соединения **39** в виде желтого липкого твердого вещества (780 мг, 53% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,27 (м, 6H), 6,90 (с, 2H), 4,94 (с, 2H), 4,62 (с, 4H), 3,58 (с, 2H), 3,16 (с, 3H), 0,83 (с, 18H), 0,00 (с, 12 H).

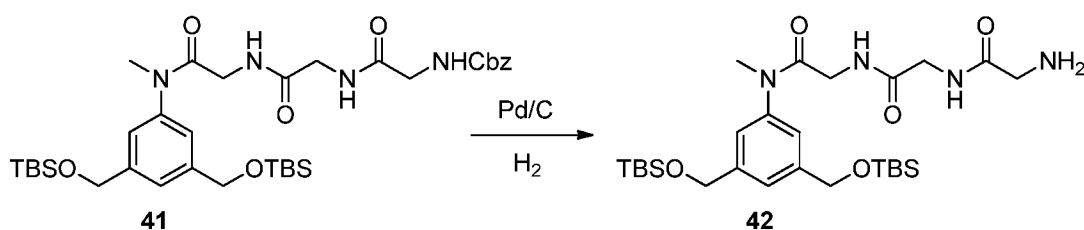


[334] **Стадия 4:** Соединение **39** (1,26 г, 2,147 ммоль) растворяли в MeOH (6,82 мл) и ТГФ

(6,8 мл) и раствор продували N_2 . Добавляли Pd/C (10%, 0,228 г, 0,215 ммоль) и несколько минут барботировали H_2 . Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит и промывали MeOH и концентрировали с получением чистого соединения **40** (1 г, 100% выход). 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 7,41-7,30 (м, 2H), 7,27-7,21 (м, 1H), 7,06 (с, 2H), 4,65 (с, 4H), 3,23 (с, 3H), 3,12 (с, 2H), 0,82 (с, 18H), 0,00 (с, 12H).

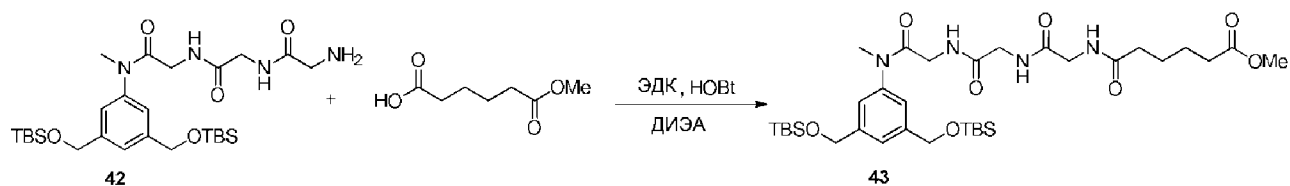


[335] **Стадия 5:** Аминное соединение **40** (1,0 г, 1,988 ммоль) и Z-Gly-Gly-Gly-OH (662 мг, 2,385 ммоль) растворяли в ДМФА (6,63 мл). ЭДК·HCl (457 мг, 2,385 ммоль) и ГОБТ (304 мг, 1,988 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (694 мкл, 3,98 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разводили EtOAc и промывали насыщ. $NaHCO_3$, соляным раствором и водой (2х). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0%-10%) с получением соединения **41** в виде белой липкой пены (994 мг, 71% выход). 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,38-7,32 (м, 7H), 7,31-7,27 (м, 2H), 7,01 (с, 2H), 5,13 (с, 2H), 4,74 (с, 4H), 3,97 (д, 2H, $J = 4,6$ Гц), 3,92 (д, 2H, $J = 5,3$ Гц), 3,74 (д, 2H, $J = 3,7$ Гц), 3,27 (с, 3H), 0,94 (с, 18H), 0,11 (с, 12H).

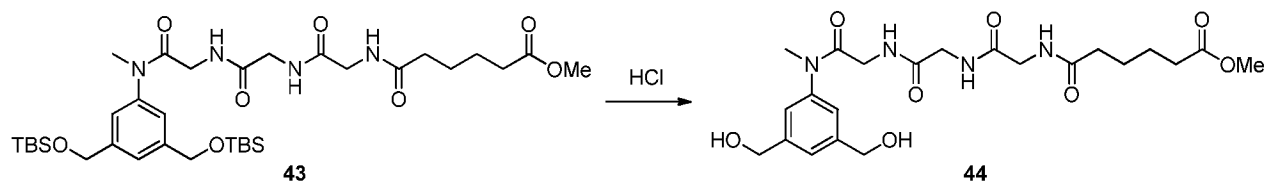


[336] **Стадия 6:** Соединение **41** (994 мг, 1,418 ммоль) суспендировали в MeOH (6,65 мл) и воде (443 мкл) и продували N_2 . Добавляли Pd/C ((10% влажный, 302 мг, 0,284 ммоль) и несколько минут барботировали H_2 . Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона на протяжении ночи. Раствор фильтровали через целит и промывали MeOH и концентрировали с получением чистого соединения **42** (725 мг, 90% выход). 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,10-7,97 (м, 1H), 7,91-7,85 (м, 1H), 7,31-7,23 (м, 1H), 7,05 (с, 2H), 7,65

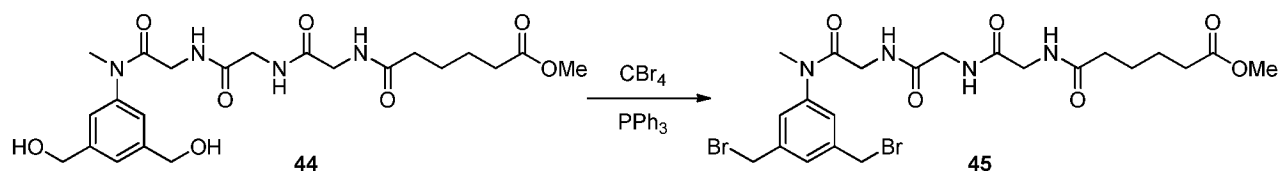
(с, 4H), 3,68-3,62 (м, 2H), 3,56-3,45 (м, 1H), 3,09 (с, 3H), 3,08-3,06 (м, 2H), 3,06-3,03 (м, 2H), 0,82 (с, 18H), 0,00 (с, 12H). ЖХМС = 5,574 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 567,30 (M+H).



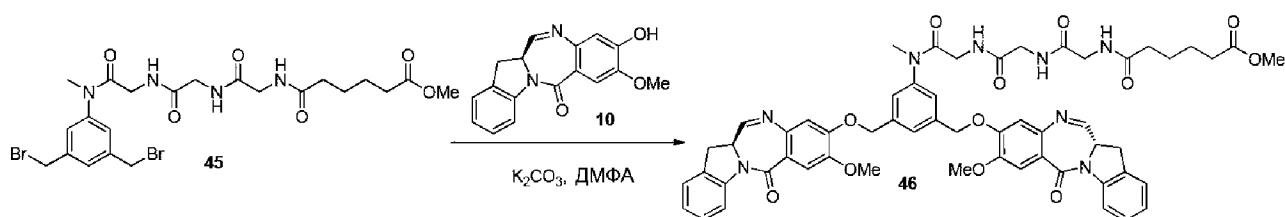
[337] **Стадия 7:** Аминное соединение **42** (725 мг, 1,279 ммоль) и метил 6-оксогеканоат (246 мг, 1,535 ммоль) растворяли в ДМФА (6,5 мл). ЭДК·НСl (294 мг, 1,535 ммоль) и ГОБт (196 мг, 1,279 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (447 мкл, 2,56 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (20 мл) и промывали насыщ. NH₄Cl, насыщ. NaHCO₃, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0%-10%) с получением соединения **43** (425 мг, 33% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,30 (с, 1H), 7,01 (с, 2H), 6,89-6,85 (м, 1H), 6,75-6,72 (м, 1H), 6,41-6,40 (м, 1H), 4,73 (с, 4H), 3,98-3,96 (м, 4H), 3,74 (шд, 2H, *J* = 3,5 Гц), 3,66 (с, 3H), 3,27 (с, 3H), 2,33 (т, 2H, *J* = 6,8 Гц), 2,28 (т, 2H, *J* = 6,5 Гц), 0,94 (с, 18H), 0,11 (с, 12H). ЖХМС = 7,709 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 709,35 (M+H).



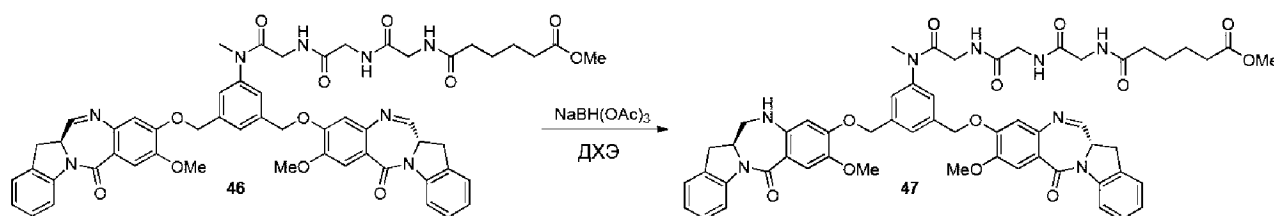
[338] **Стадия 8:** Соединение **43** (422 мг, 0,417 ммоль) растворяли в ТГФ (1,89 мл) и воде (189 мкл). HCl (водная, 5 М) (833 мкл, 4,17 ммоль) добавляли и перемешивали при кт на протяжении 2,5 ч. Реакционную смесь концентрировали. АСН (~ 15 мл) добавляли к остатку и концентрировали. Повторяли операцию дважды с получением соединения **44** в виде белой пены (200 мг, 100% выход). ЖХМС = 0,389 мин (8-минутный метод). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 8,09-8,04 (м, 2H), 7,93-7,90 (м, 1H), 7,30 (шс, 1H), 7,14 (с, 2H), 4,52 (с, 4H), 3,71-3,68 (м, 4H), 3,58 (с, 3H), 3,17 (шс, 3H), 2,22-2,18 (м, 2H), 2,15-2,12 (м, 2H), 1,53-1,47 (м, 4H).



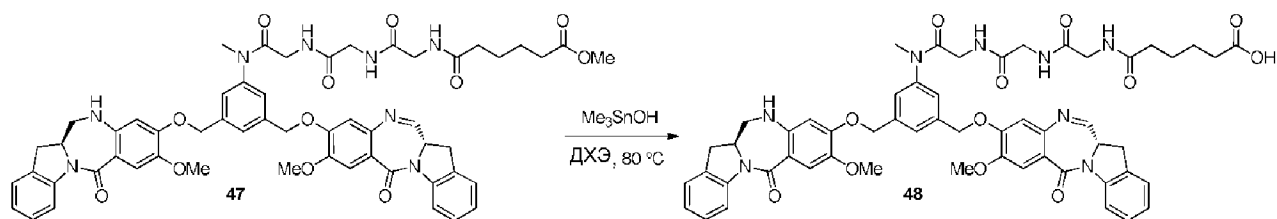
[339] **Стадия 9:** Диольное соединение **44** (110 мг, 0,229 ммоль) и CBr_4 (228 мг, 0,687 ммоль) растворяли в ДМФА (2,29 мл). PPh_3 (180 мг, 0,687 ммоль) добавляли в реакционную смесь, при этом реакция окрасилась в красновато-розовый цвет с легким экзотермическим эффектом. Реакционную смесь перемешивали под Ar на протяжении 6 часов. Реакционную смесь разбавляли $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1) и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, градиент, 0%-10%) с получением соединения **45** (30 мг, 22% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,46 (шс, 1H), 7,32-7,26 (м, 2H), 7,26-7,19 (м, 2H), 6,89-6,85 (м, 1H), 4,60 (д, 2H, $J = 3,6$ Гц), 4,48 (д, 2H, $J = 3,9$ Гц), 3,98 (д, 4H, $J = 5,1$ Гц), 3,76 (шс, 1H), 3,67 (с, 3H), 3,30 (шс, 3H), 2,34 (шт, 2H, $J = 6,7$ Гц), 2,30 (шт, 2H, $J = 6,6$ Гц), 1,70-1,64 (м, 4H). ЖХМС = 4,326 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 605,10 (M+H).



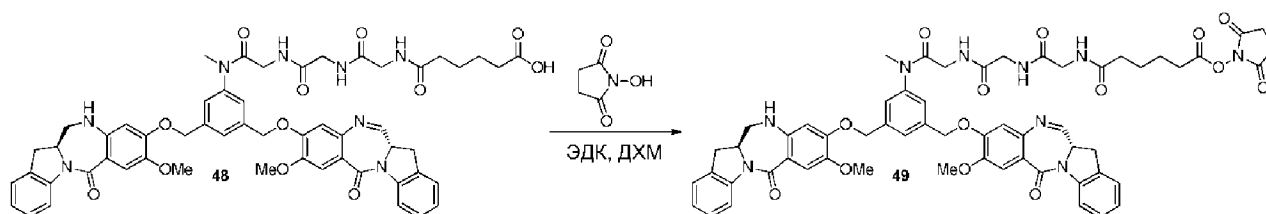
[340] **Стадия 10:** Соединение **46** получали так же, как и соединение **11** в Примере 1. Соединение **46** было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (40 мг, 59% выход). ЖХМС = 4,751 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 1033,35 (M+H).



[341] **Стадия 11:** Соединение **47** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Соединение **47** было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (14 мг, 32% выход). ЖХМС = 5,857 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ^+): 1035,7 (M+H).

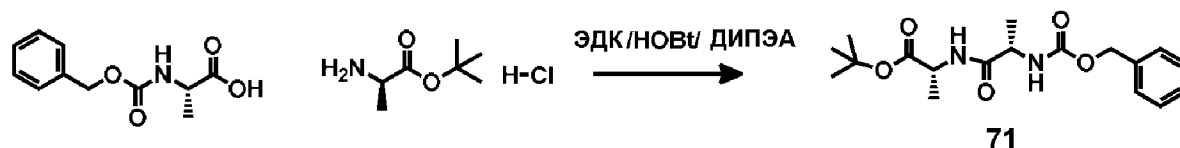


[342] **Стадия 12:** Соединение **48** получали так же, как и соединение **22** в Примере 2. Соединение **48** было получено в виде желтого твердого вещества после очистки с силикагелем (7 мг, 100% выход). ЖХМС = 4,817 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1021,35 (M+N).



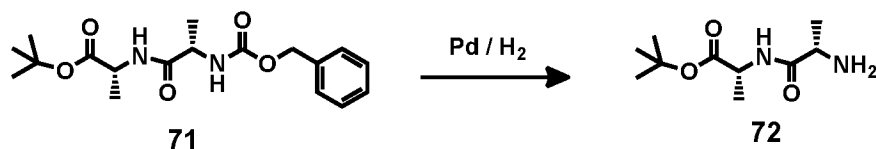
[343] **Стадия 13:** Соединение **49** получали так же, как и соединение **14** в Примере 1. 2,5-диоксопирролидин-1-ил 2-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4] диазепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-3,6,9,12-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазагептадекан-17-оат, соединение **49** было получено как белое твердое вещество после очистки C18 (6,5 мг, 74% выход). ЖХМС = 5,805 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1118,7 (M+N).

Пример 5. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((((S)-1-(((R)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((R)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил) фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноата (соединение **80**)

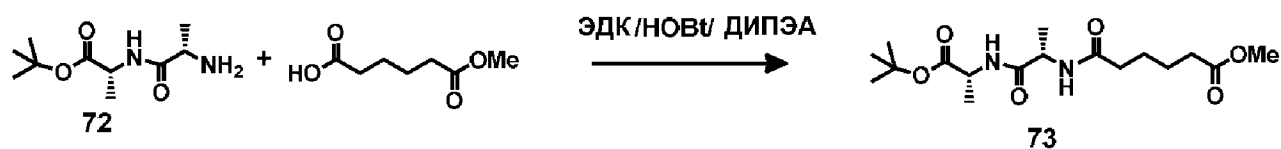


Стадия 1: (S)-2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропановую кислоту (5 г, 22,40 ммоль) и (R)-*трет*-бутил 2-аминопропаноат гидрохлорид (4,48 г, 24,64 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (44,8 мл). Добавляли ЭДК·НСl (4,72 г, 24,64 ммоль), ГОБт (3,43 г, 22,40 ммоль), и затем ДИПЭА (9,75 мл, 56,0 ммоль). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и

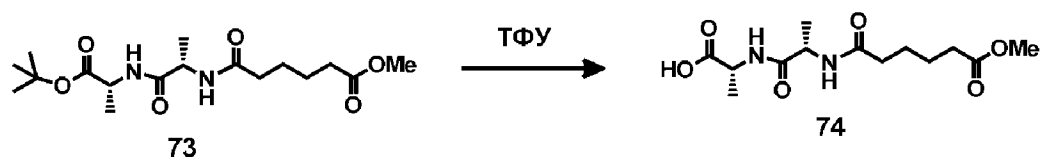
затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. Сырое масло очищали хроматографией на силикагеле (Гексаны/этилацетат) чтобы получить соединение **71** (5,6 г, 71% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,39-7,34 (м, 5H), 6,54 (с, 1H) 5,28 (с, 1H), 5,15 (с, 2H), 4,47-4,43 (м, 1H), 4,48 (с, 1H), 1,49 (с, 9H), 1,42-1,37 (м, 6H).



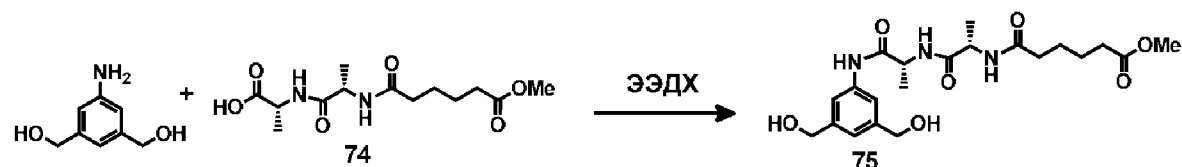
[344] **Стадия 2:** Соединение **71** (5,6 г, 15,98 ммоль) растворяли в метанол (50,7 мл) и воде (2,54 мл). Раствор продували аргоном на протяжении 5 минут. Медленно добавляли палладий на углеводе (влажный, 10%) (0,850 г, 0,799 ммоль). Смесь перемешивали на протяжении ночи в атмосфере водорода. Раствор фильтровали через целит, промывали метанолом и концентрировали. Остаток обезвоживали азеотропной перегонкой с метанолом и ацетонитрилом и полученное масло помещали напрямую под высокий вакуум, чтобы получить соединение **72** (3,57 г, 100% выход) которое использовали на следующей стадии. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,67 (с, 1H), 4,49-4,42 (м, 1H), 3,54-3,49 (м, 1H), 1,48 (с, 9H), 1,40 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,36 (д, 3H, $J = 6,8$ Гц).



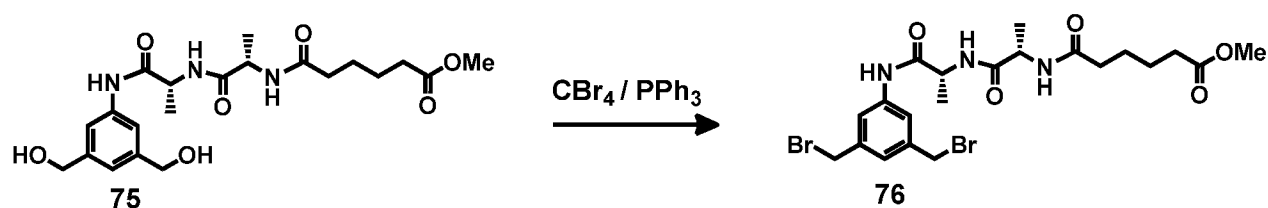
Стадия 3: Соединение **72** (3,57 г, 16,51 ммоль) и монометиладипат (2,69 мл, 18,16 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (55,0 мл). ЭДК·HCl (3,48 г, 18,16 ммоль) и ГОБт (2,53 г, 16,51 ммоль) добавляли, с последующим добавлением ДИПЭА (5,77 мл, 33,0 ммоль). Получившуюся смесь перемешивали при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном/метанолом (80 мл, 5:1) и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Соединение обезвоживали азеотропной перегонкой с ацетонитрилом (5х), затем сушили под высоким вакуумом при 35 °С, чтобы получить соединение **73** (5,91 г, 100% выход). Неочищенный материал использовали в следующей стадии без очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 6,67 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 6,22 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц), 4,56-4,49 (м, 1H), 4,46-4,38 (м, 1H), 3,68 (с, 3H), 2,37-2,33 (м, 2H), 2,27-2,24 (м, 2H), 1,70 -1,68 (м, 4H), 1,47 (с, 9H), 1,40 (с, 3H), 1,38 (с, 3H).



[345] **Стадия 4:** Соединение **73** (5,91 г, 16,5 ммоль) перемешивали в ТФУ (25,4 мл, 330 ммоль) и деионизированной воде (1,3 мл) при кт на протяжении 3 ч. Реакционную смесь концентрировали ацетонитрилом и помещали под высокий вакуум до высыхания с получением сырого соединения **74** (4,99 г, 100% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,44 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц), 6,97 (д, 1H, $J = 8,0$ Гц), 4,81-4,73 (м, 1H), 4,59-4,51 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 2,39-2,32 (м, 2H), 2,31-2,23 (м, 2H), 1,70-1,61 (м, 4H), 1,48(д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,40 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц).

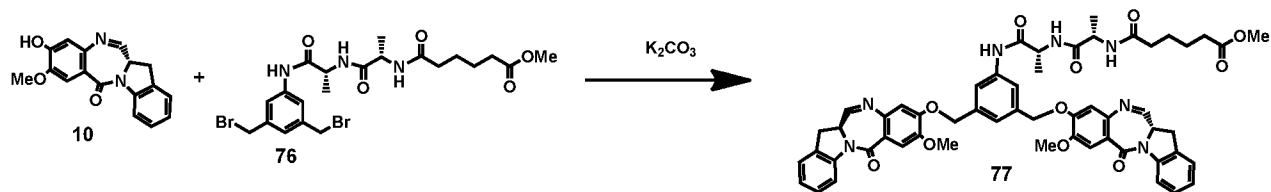


[346] **Стадия 5:** Соединение **74** (4,8 г, 15,88 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (101 мл) и безводном метаноле (50,4 мл). (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (2,316 г, 15,12 ммоль) и ЭЭДХ (7,48 г, 30,2 ммоль) добавляли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель упаривали и сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение **75** (1,65 г, 25% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMCO-}d_6$): δ 9,68 (с, 1H), 8,29 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц), 8,11 (д, 1H, $J = 6,4$ Гц), 7,52 (с, 2H), 6,97 (с, 1H), 5,15 (с, 2H), 4,45 (с, 4H), 4,39-4,32 (м, 1H), 4,28-4,21 (м, 1H), 3,57 (с, 3H), 2,30-2,27 (м, 2H), 2,17-2,13 (м, 2H), 1,54-1,45 (м, 4H) 1,30 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,20 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц). МС (m/z): 460,2 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

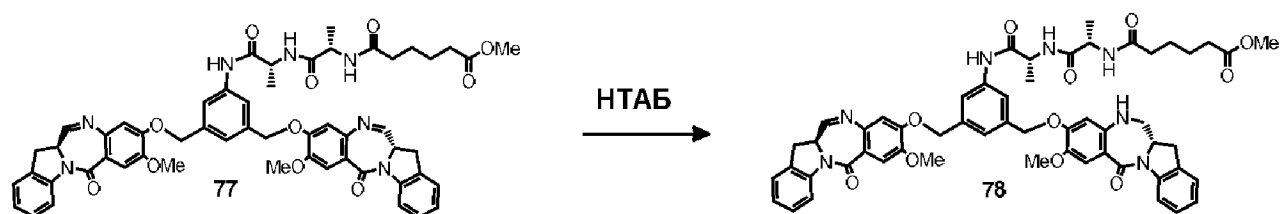


[347] **Стадия 6:** Соединение **75** (0,486 г, 1,111 ммоль) и карбонтетрабромид (1,105 г, 3,33 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (11,11 мл). Добавляли трифенилфосфин (0,874 г, 3,33 ммоль) и смесь перемешивали в атмосфере аргона 4 часа. Реакционную смесь разводили ДХМ/МеОН (10:1) и промывали водой и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/МеОН), чтобы получить соединение **76** (250 мг, 40%

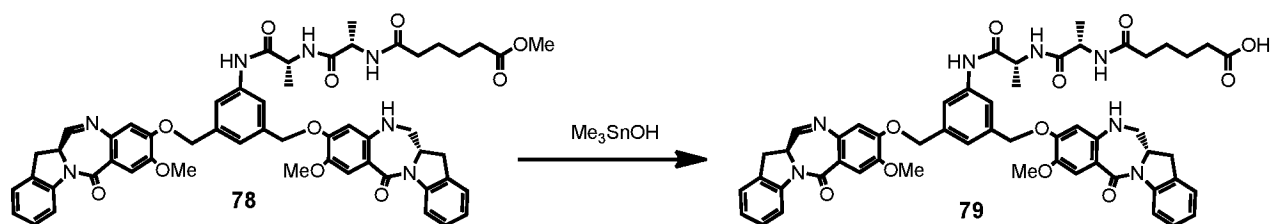
выход), ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 9,82 (с, 1H), 8,38 (д, 1H, *J* = 7,2 Гц), 8,17 (д, 1H, *J* = 6,0 Гц), 7,76 (с, 2H), 7,22 (с, 1H), 4,66 (с, 4H), 4,38-4,31 (м, 1H), 4,25-4,19 (м, 1H), 3,56 (с, 3H), 2,30-2,27 (м, 2H), 2,18-2,15 (м, 2H), 1,53-1,51 (м, 4H), 1,32 (д, 3H, *J* = 7,2 Гц), 1,21 (д, 3H, *J* = 6,8 Гц).



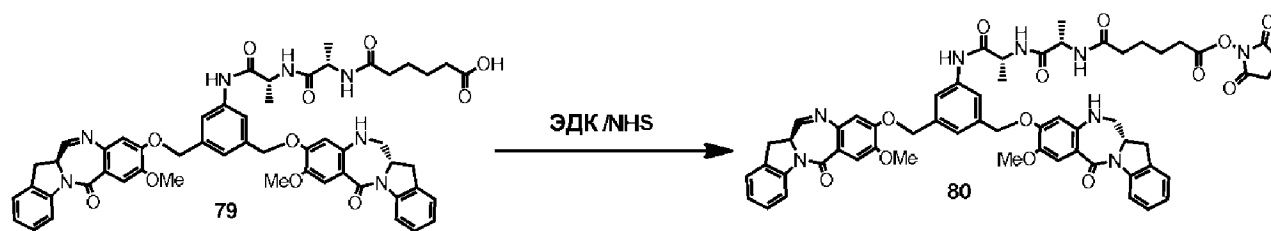
[348] **Стадия 7:** Соединение 77 получали так же, как и 11 в Примере 1. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение 77 (340 мг, 60% выход, 77% чистота). ЖХМС = 5,87 мин (15-минутный метод). МС (*m/z*): 990,6 (*M* + 1)⁺.



[349] **Стадия 8:** Соединение 78 получали так же, как и соединение 12 в Примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, ацетонитрил/вода)/ чтобы получить соединение 78 (103 мг, 30% выход). ЖХМС = 6,65 мин (15-минутный метод). МС (*m/z*): 992,7 (*M* + 1)⁺.

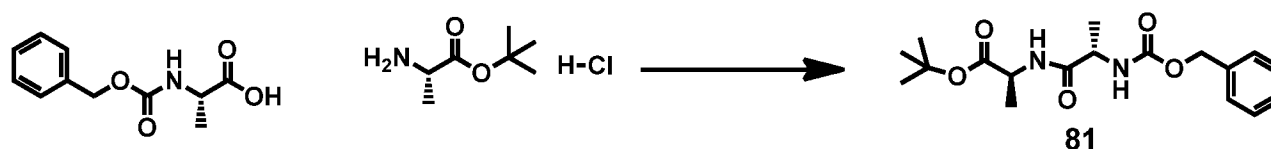


[350] **Стадия 9:** Соединение 78 получали так же, как и 22 в Примере 2. Сырой материал очищали с помощью силикагеля, чтобы получить соединение 79 (38 мг, 55% выход, 75% чистота). ЖХМС = 5,83 мин (15-минутный метод). МС (*m/z*): 978,6 (*M* + 1)⁺.

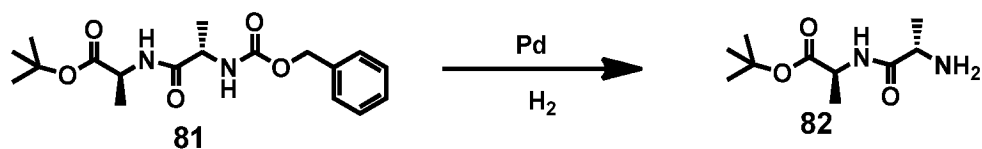


[351] **Стадия 10:** Соединение **80** получали так же, как и соединение **14** в Примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((R)-1-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((R)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил) фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение **80** (6,5 мг, 30% выход). ЖХМС = 6,53 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1075,7 (M + 1)⁺ и 1097,7(M + Na)⁺.

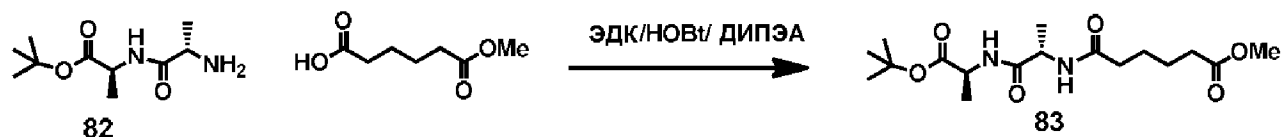
Пример 6. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((R)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил) фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноата, соединение **90**



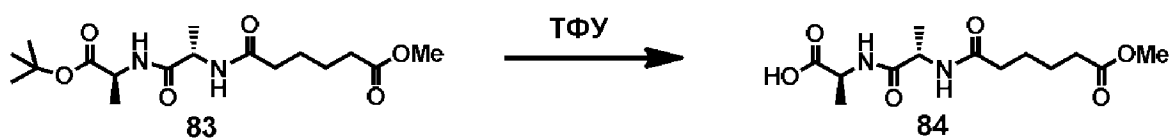
[352] **Стадия 1:** (S)-2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропановой кислота (5 г, 22,40 ммоль) и (S)-*трет*-бутил 2-аминопропаноат гидрохлорид (4,48 г, 24,64 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (44,8 мл). Добавляли ЭДК·НСl (4,72 г, 24,64 ммоль), ГОБт (3,43 г, 22,40 ммоль), и ДИПЭА (9,75 мл, 56,0 ммоль). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. Сырое масло очищали хроматографией на силикагеле (Гексаны/этилацетат), чтобы получить соединение **81** (6,7 г, 85% выход). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,38-7,31 (м, 5Н), 6,53-6,42 (м, 1Н), 5,42-5,33 (м, 1Н), 5,14 (с, 2Н), 4,48-4,41 (м, 1Н), 4,32-4,20 (м, 1Н), 1,49 (с, 9Н), 1,42 (д, 3Н, J = 6,8 Гц), 1,38 (д, 3Н, J = 7,2 Гц).



[353] **Стадия 2:** Соединение **81** (6,7 г, 19,12 ммоль) растворяли в метаноле (60,7 мл) и воде (3,03 мл). Раствор продували аргоном на протяжении 5 минут. Медленно добавляли палладий на углеводе (влажный, 10%) (1,017 г, 0,956 ммоль). Смесь перемешивали на протяжении ночи в атмосфере водорода. Раствор фильтровали через целит, промывали метанолом и концентрировали. Обезвоживали азеотропной перегонкой с метанолом и ацетонитрилом и полученное масло помещали напрямую под высокий вакуум, чтобы получить соединение **82** (4,02 г, 97% выход), которое использовали в следующей стадии напрямую. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,78-7,63 (м, 1H), 4,49-4,42 (м, 1H), 3,55-3,50 (м, 1H), 1,73 (с, 2H), 1,48 (с, 9H), 1,39 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,36 (д, 3H, $J = 6,8$ Гц).

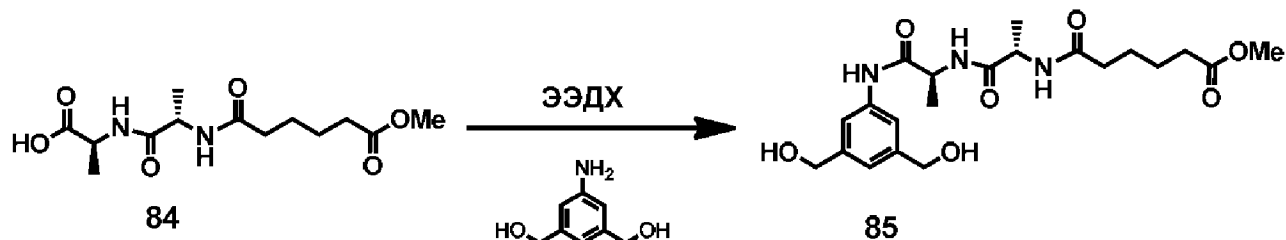


[354] **Стадия 3:** Соединение **82** (4,02 г, 18,59 ммоль) и монометиладипат (3,03 мл, 20,45 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (62,0 мл). ЭДК·НСl (3,92 г, 20,45 ммоль), ГОБт (2,85 г, 18,59 ммоль) и ДИПЭА (6,49 мл, 37,2 ммоль) добавляли. Получившуюся смесь перемешивали при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном/метанолом (150 мл, 5:1) и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Соединение обезвоживали азеотропной перегонкой с ацетонитрилом (5х), затем под высоким вакуумом при 35 °С, чтобы получить соединение **83** (6,66 г, 100% выход). Неочищенный материал использовали в следующей стадии без очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 6,75 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 6,44 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 4,52-4,44 (м, 1H), 4,43-4,36 (м, 1H), 3,65 (с, 3H), 2,35-2,29 (м, 2H), 2,25-2,18 (м, 2H), 1,71-1,60 (м, 4H), 1,45 (с, 9H), 1,36 (т, 6H, $J = 6,0$ Гц).

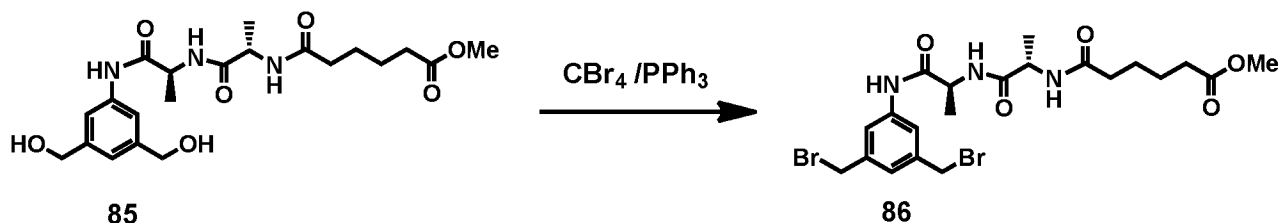


[355] **Стадия 4:** Соединение **83** (5,91 г, 16,5 ммоль) перемешивали в ТФУ (28,6 мл, 372 ммоль) и деионизированной воде (1,5 мл) при кт на протяжении 3 ч. Реакционную смесь концентрировали ацетонитрилом и помещали под высокий вакуум, чтобы получить сырое

соединение **84** в виде липкого твердого вещества (5,88 г, 100% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,21 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 6,81 (д, 1H, $J = 7,6$ Гц), 4,69-4,60 (м, 1H), 4,59-4,51 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 2,40-2,33 (м, 2H), 2,31-2,24 (м, 2H), 1,72-1,63 (м, 4H), 1,51-1,45 (м, 3H), 1,42-1,37 (м, 3H).

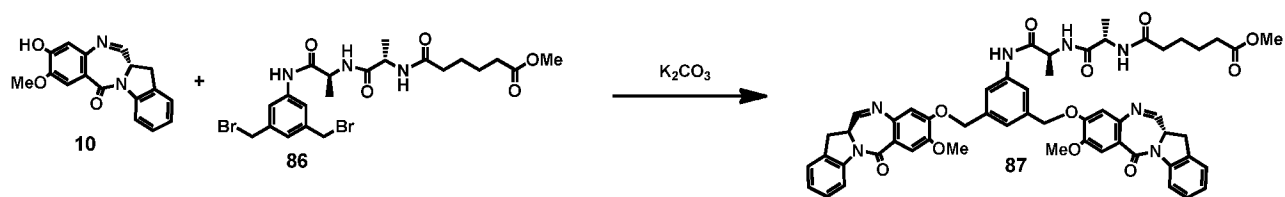


[356] **Стадия 5:** Соединение **84** (5,6 г, 18,52 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (118 мл) и безводном метаноле (58,8 мл). (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (2,70 г, 17,64 ммоль) и ЭЭДХ (8,72 г, 35,3 ммоль) добавляли в реакционную смесь, перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель упаривали и добавляли этилацетат. Полученную суспензию фильтровали, промывали этилацетатом и сушили в вакууме/ N_2 , чтобы получить соединение **85** (2,79 г, 36% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9,82 (с, 1H), 8,05 (д, 1H, $J = 9,2$ Гц), 8,01 (д, 1H, $J = 7,2$ Гц), 7,46 (с, 2H), 6,95 (с, 1H), 5,21-5,12 (м, 2H), 4,47-4,42 (м, 4H), 4,40-4,33 (м, 1H), 4,33-4,24 (м, 1H), 3,58 (с, 3H), 2,33-2,26 (м, 2H), 2,16-2,09 (м, 2H), 1,54-1,46 (м, 4H), 1,30 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,22 (д, 3H, $J = 4,4$ Гц).

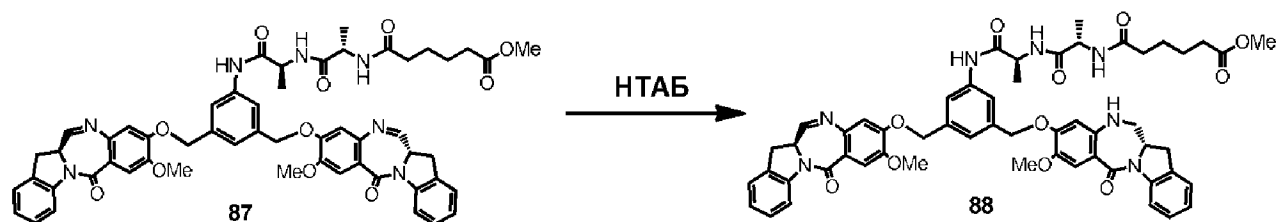


[357] **Стадия 6:** Соединение **85** (0,52 г, 1,189 ммоль) и карбонтетрабромид (1,183 г, 3,57 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (11,89 мл). Добавляли трифенилфосфин (0,935 г, 3,57 ммоль) и смесь перемешивали в атмосфере аргона 4 часа. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (10:1) и промывали водой и соляным раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/MeOH), чтобы получить соединение **86** (262 мг, 39% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10,01 (с, 1H), 8,11 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 8,03 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 7,67 (с, 2H), 7,21 (с, 1H), 4,70-4,64 (м, 4H), 4,40-4,32 (м, 1H), 4,31-4,23 (м, 1H), 3,58 (с, 3H), 2,34-2,26 (м, 2H), 2,18-2,10 (м, 2H), 1,55-1,45 (м, 4H), 1,31 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц),

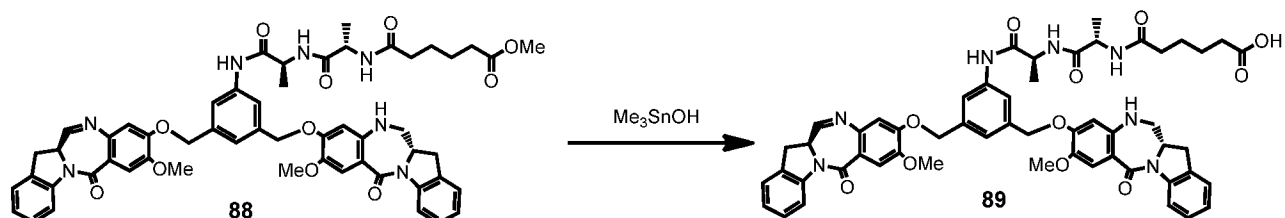
1,21 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц).



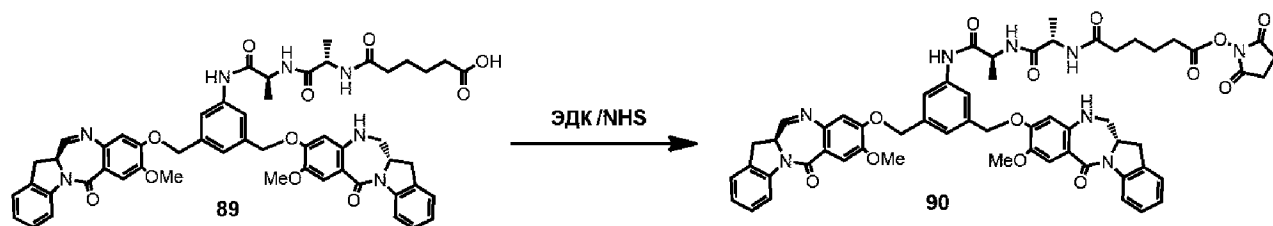
[358] **Стадия 7:** Соединение **87** получали так же, как и соединение **11** в Примере 1. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение **87** (336 мг, 74% выход). ЖХМС = 5,91 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 990,6 (M + 1)⁺.



[359] **Стадия 8:** Соединение **88** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить соединение **88** (85,5 мг, 25% выход). ЖХМС = 6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 992,6 (M + 1)⁺.



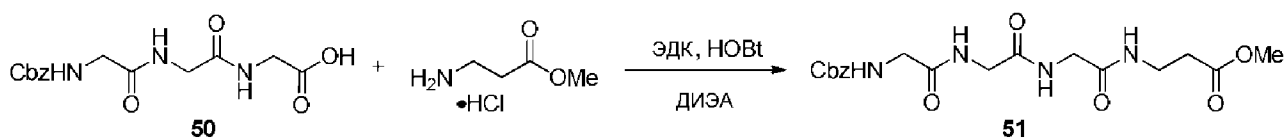
[360] **Стадия 9:** Соединение **88** получали так же, как и **22** в Примере 2. Сырой материал пропускали через силикагелевую пробку, чтобы получить соединение **89** (48,8 мг, 80% выход). ЖХМС = 5,89 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 978,6 (M+1)⁺.



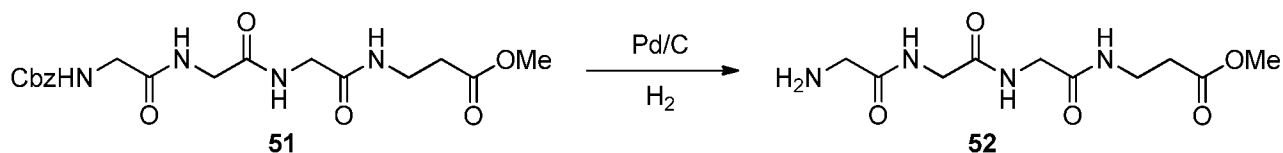
[361] **Стадия 10:** Соединение **90** получали так же, как и **14** в Примере 1. Сырой материал

очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((R)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение **90** (8,2 мг, 30% выход). ЖХМС = 6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1075,4 (M + 1)⁺.

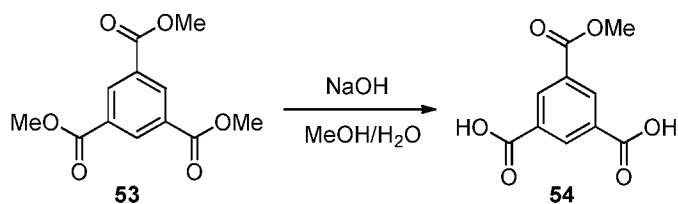
Пример 7. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazеино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-1,4,7,10-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазатетрадекан-14-оата (соединение **63**)



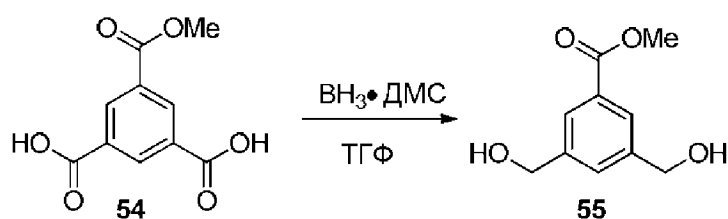
[362] **Стадия 1:** Z-Gly-Gly-GlyOH соединение **50** (1,0 г, 3,09 ммоль) и β-аланина метиловый эфир·HCl (453 мг, 3,25 ммоль) растворяли в ДМФА (12,37 мл). ЭДК·HCl (623 мг, 3,25 ммоль) и ГОБт (497 мг, 3,25 ммоль) добавляли в реакционную смесь, с последующим добавлением ДИЭА (1,08 мл, 6,19 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. На следующий день образовалось много белого осадка. Реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂/MeOH (5:1, 30 мл) и промывали насыщ. NaHCO₃, насыщ. NH₄Cl и соляным раствором. Органический слой стал мутным. Добавили EtOAc (15 мл) к органическому слою, чтобы осадить продукт. Смесь фильтровали, и твердое вещество промывали водой (10 мл) и CH₃CN (2 x 15 мл) с получением чистого соединения **51** в виде белого порошка (880 мг, 70% выход) без очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,16 (шт, 1H, J = 5,4 Гц), 8,11 (шт, 1H, J = 5,6 Гц), 7,88-7,85 (м, 1H), 7,49 (шт, 1H, J = 5,5 Гц), 7,40-7,31 (м, 5H), 5,04 (с, 2H), 3,74 (д, 2H, J = 5,5 Гц), 3,67 (т, 4H, J = 6,2 Гц), 3,60 (с, 3H), 3,29 (к, 1H, J = 6,4 Гц), 2,47 (т, 3H, J = 6,9 Гц).



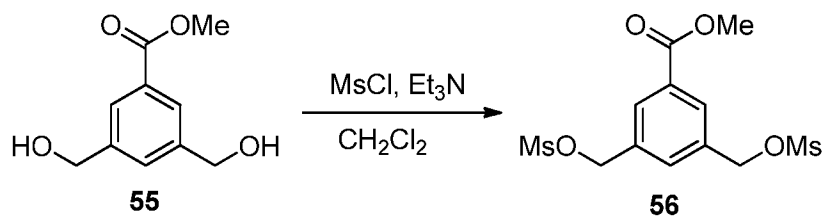
[363] **Стадия 2:** Соединение **51** (876 мг, 2,145 ммоль) растворяли в MeOH (20,4 мл) и воде (1,02 мл) и продували Ar. Раствор дегазировали 5 минут медленно добавляли Pd/C (10%, влажный 50% воды, 228 мг). На минуту барботировали из баллона H₂. Реакционную смесь перемешивали в токе H₂ из баллона на протяжении ночи. H₂O (~ 3 мл) добавляли в реакционную смесь для растворения всех образованных белых твердых веществ. Раствор фильтровали через целит, фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. Остаток растворяли в CH₃CN (20 мл) и концентрировали. Процедуру повторяли 2 раза. Полученное резиновое твердое вещество осаждали добавлением CH₃CN (~ 15 мл). Густую белую суспензию перемешивали на протяжении 10 мин, фильтровали и промывали CH₃CN. Твердое вещество сушили под вакуумом/N₂ 1,5 ч с получением соединения **52** в виде белого твердого вещества (450 мг, 76% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,18-8,12 (м, 2H), 7,88 (т, 1H, *J* = 5,4 Гц), 3,75 (с, 2H), 3,65 (д, 2H, *J* = 5,9 Гц), 3,6 (с, 3H), 3,33-3,27 (м, 4H), 2,47 (т, 2H, *J* = 7,0 Гц), 1,94 (шс, 1H).



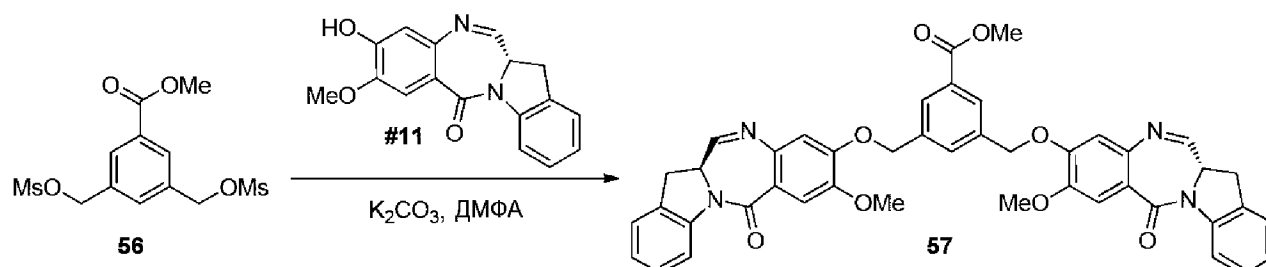
[364] **Стадия 3:** NaOH (1,665 г, 41,6 ммоль) добавляли в перемешиваемый раствор триметилбензол-1,3,5-трикарбоксилата, соединение **53** (5 г, 19,82 ммоль) в MeOH (66,1 мл) и воде (13,22 мл). Реакционную смесь нагревали с дефлегматором под Ar на протяжении 3 ч. Образовалось много белого осадка. Раствор охлаждали до кт и разбавляли H₂O пока все твердые вещества не растворились. Смесь подкисляли до pH ~ 2-3 водной 5 N HCl, экстрагировали EtOAc (3x), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Сырой продукт растворяли в горячем EtOAc (50 мл) и медленно охлаждали до кт. Осадок фильтровали (осадок был побочным продуктом, а не продуктом). Маточник концентрировали с получением соединения **54** в виде белого твердого вещества (3,45 г, 78% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 13,62 (шс, 2H), 8,65 (с, 3H), 3,93 (с, 3H). ЖХМС = 3,209 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 244,90 (M+H).



[365] **Стадия 4:** Дикислотное соединение **54** (1,0 г, 4,46 ммоль) растворяли в ТГФ (17,84 мл). Раствор охлаждали до 0 °С и $\text{ВН}_3 \cdot \text{ДМС}$ (2 М в ТГФ) (8,92 мл, 17,84 ммоль) добавляли медленно под Ar . Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 5 мин, а затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакция была открыта для воздуха и медленно гасилась MeOH , с последующим медленным добавлением H_2O до тех пор, пока не перестали наблюдаться выделения газа. Смесь экстрагировали EtOAc (2 ×) и слои разделяли. Органические слои промывали водным ~ 3% H_2O_2 , водн. раствором лимонной кислоты и соляным раствором, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc /Гексаны, градиент, 20%-100%) с получением диольного соединения **55** в виде белого твердого вещества (385 мг, 44% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6): δ 7,81 (с, 2H), 7,52 (с, 1H), 5,33 (шс, 2H), 4,56 (с, 4H), 3,86 (с, 3H).

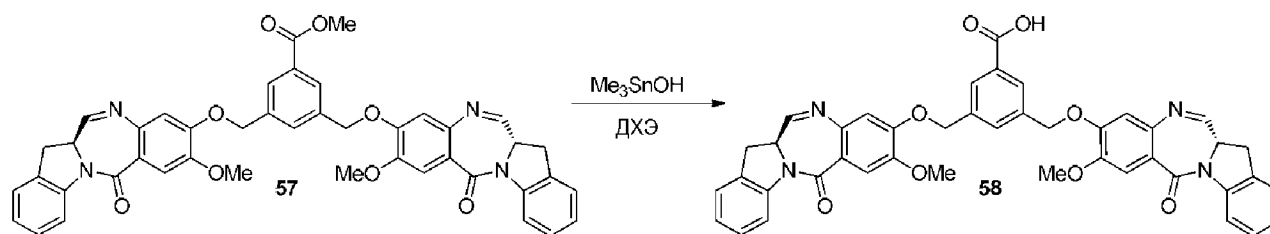


[366] **Стадия 5:** Диольное соединение **55** (320 мг, 1,631 ммоль) растворяли в ДХМ (10,9 мл) под Ar . Раствор охлаждали до -5 °С и добавляли ТЭА (0,568 мл, 4,08 ммоль), с последующим медленным добавлением MsCl (0,292 мл, 3,75 ммоль), при этом цвет немедленно стал желтым, затем темно-красным/коричневым. Реакционную смесь перемешивали при -5 °С под Ar в течение 1,5 ч. Реакционную смесь погасили ледяной водой и экстрагировали EtOAc (2x). Органический слой промывали водой (2x), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением сырого димезилатного соединения **56** (435 мг, 76% выход).

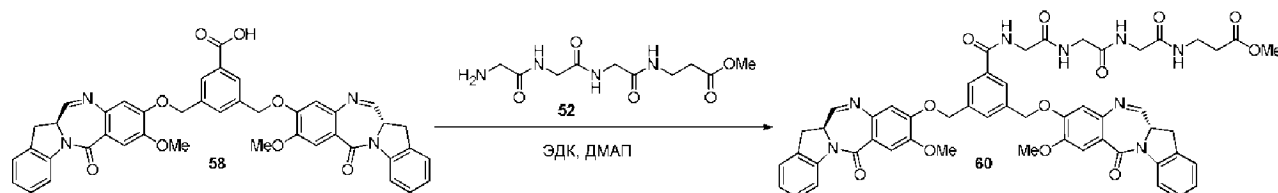


[367] **Стадия 6:** Димезилатное соединение **56** (435 мг, 1,11 ммоль) растворяли в ДМФА (5,55 мл). IGN мономер, соединение **10** (719 мг, 2,444 ммоль) добавляли, с последующим добавлением K_2CO_3 (384 мг, 2,78 ммоль) и перемешивали при кт в атмосфере Ar на протяжении ночи. Воду (20 мл) добавляли для осаждения продукта. Суспензию

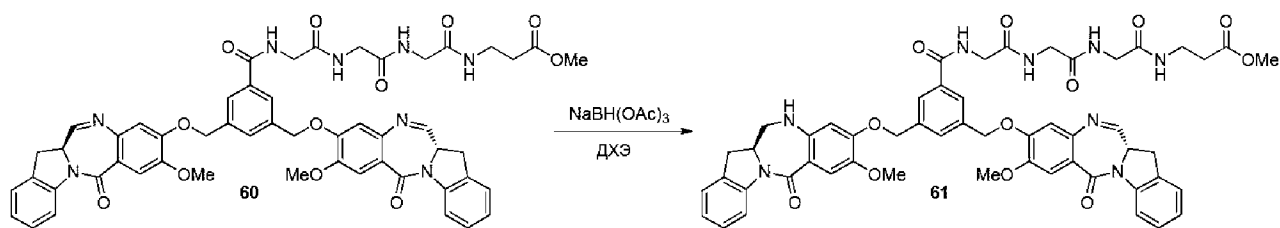
перемешивали на протяжении 5 мин и затем фильтровали и сушили под вакуумом/ N_2 на протяжении 1,5 ч. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/Гексаны, градиент, 50%-100%; затем 5% MeOH/ДХМ) с получением соединения **57** в виде желтого твердого вещества (535 мг, 64% выход, 2 стадии). ЖХМС = 6,973 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса ($ЭРИ^+$): 749,4 (M+H).



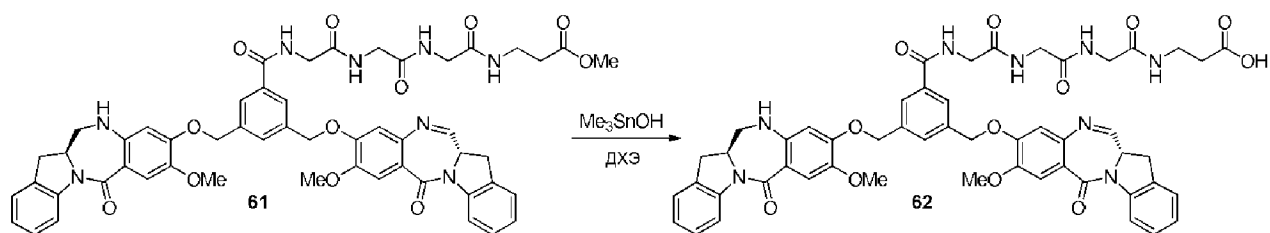
[368] **Стадия 7:** Соединение **57** (100 мг, 0,134 ммоль) растворяли в ДХЭ (1,34 мл). Триметилстаннанол (362 мг, 2,003 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80 °С на протяжении ночи. Реакционную смесь охлаждали до кт и разбавляли водой. Водный слой подкисляли до pH ~4 1 М HCl и экстрагировали ДХМ (3x), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт пробивали через короткую пластинку силикагеля и смывали ДХМ/MeOH (10:1, 50 мл) и концентрировали с получением соединения **58** в виде бледно-желтого твердого вещества (100 мг, 100% выход). ЖХМС = 5,872 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса ($ЭРИ^+$): 735,3 (M+H).



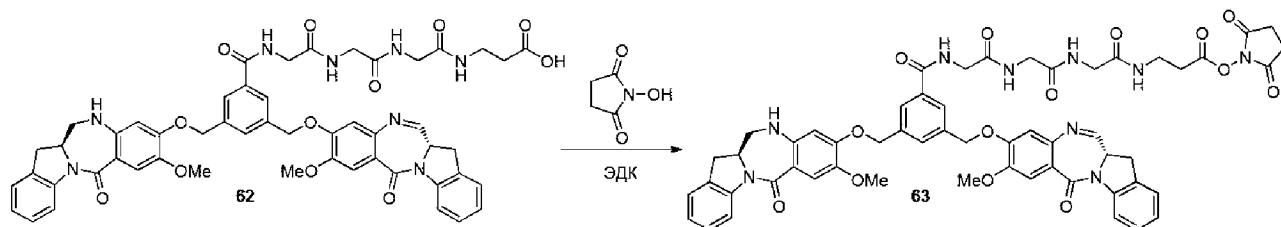
[369] **Стадия 8:** Кислотное соединение **58** (80 мг, 0,087 ммоль) и аминное соединение **52** (36 мг, 0,131 ммоль) растворяли в ДМФА (871 мкл). ЭДК·HCl (25 мг, 0,131 ммоль) и ДМАП (10,6 мг, 0,087 ммоль) добавляли и перемешивали при кт 4 ч. Воду (4 мл) добавляли для осаждения продукта. Суспензию перемешивали на протяжении 5 мин, фильтровали и сушили под вакуумом/ N_2 . Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0%-20%) с получением соединения **60** в виде желтого твердого вещества (37 мг, 43% выход). ЖХМС = 4,605 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса ($ЭРИ^+$): 991,35 (M+H).



[370] **Стадия 9:** Соединение **61** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Соединение **61** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (8 мг, 25% выход). ЖХМС = 5,421 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 993,7 (M+H).



[371] **Стадия 10:** Соединение **62** получали так же, как и соединение **22** в Примере 2. Сырое соединение **62** было получено в виде желтого твердого вещества после силикагелевой очистки (13 мг, 90% выход). ЖХМС = 4,693 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 979,35 (M+H).



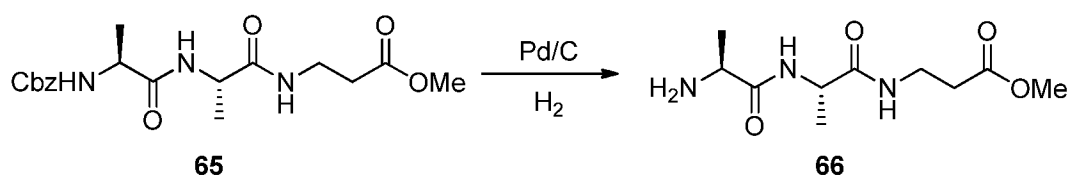
[371] **Стадия 11:** Соединение **63** получали так же, как и соединение **14** в Примере 1. 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6H-бензо [5,6][1,4]diazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-1,4,7,10-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазатетрадекан-14-оат, соединение **63** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (4 мг, 31% выход). ЖХМС = 5,495 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1076,7 (M+H).

Пример 8. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((S)-2-((S)-2-(3-((((S)-8-метокси-6-

оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)бензамидо)пропанамидо)пропанамидо)пропаноата (соединение **70**)

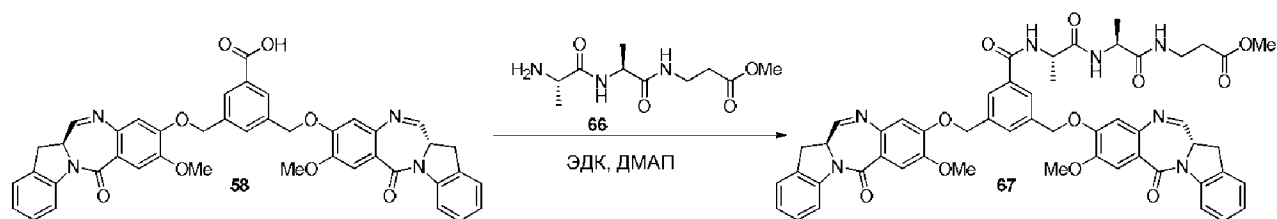


[372] Стадия 1: Z-L-Ala-L-Ala-OH соединение **64** (3,0 г, 10,19 ммоль) и β-аланина метиловый эфир·HCl (1,565 г, 11,21 ммоль) растворяли в ДМФА (20,39 мл). ЭДК·HCl (2,150 г, 11,21 ммоль) и ГОБт (1,561 г, 10,19 ммоль) добавляли, с последующим добавлением ДИПЭА (4,44 мл, 25,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт под Ag на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщ. NH₄Cl, насыщ. NaHCO₃ и соевым раствором. Гексаны добавляли к органическому слою, при этом раствор стал мутным и выпал осадок. Суспензию перемешивали на протяжении нескольких минут, фильтровали и отмывали твердые вещества EtOAc/Гексаны (3:1). Твердое вещество сушили под вакуумом/N₂ с получением чистого соединения **65** в виде белого твердого вещества (3,11 г, 80% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 7,91 (д, 2H, *J* = 7,0 Гц), 7,46 (д, 1H, *J* = 7,4 Гц), 6,39-7,30 (м, 5H), 5,02 (д, 2H, *J* = 2,3 Гц), 4,20 (п, 1H, *J* = 7,2 Гц), 4,04 (п, 1H, *J* = 7,3 Гц), 3,59 (с, 3H), 3,30-3,22 (м, 1H), 2,45 (т, 2H, *J* = 6,8 Гц), 1,18 (различимый т, 6H, *J* = 7,2 Гц). ЖХМС = 3,942 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 380,10 (M+H).

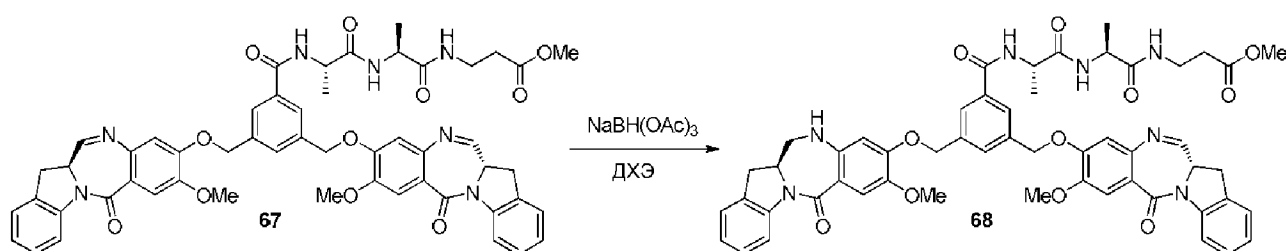


[373] Стадия 2: Соединение **65** (1,0 г, 2,64 ммоль) растворяли в метаноле (12,55 мл), воде (0,628 мл) и ТГФ (2 мл). Раствор продували Ag и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (10%, влажный 50% воды, 0,140 г). На минуту барботировали из баллона H₂ и реакционную смесь дальше перемешивали в токе H₂ (1 атм) из баллона на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит и промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. CH₃CN (15 мл) добавляли к остатку и концентрировали. Процедуру повторили 2 раза с получением соединения **66** в виде почти белого твердого вещества (650 мг, 100% выход). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8,03-7,99 (м, 2H), 4,24-4,18 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,31-3,22 (м, 5H), 2,46 (т, 2H, *J* = 6,8 Гц), 1,17 (д, 3H, *J* = 7,0 Гц),

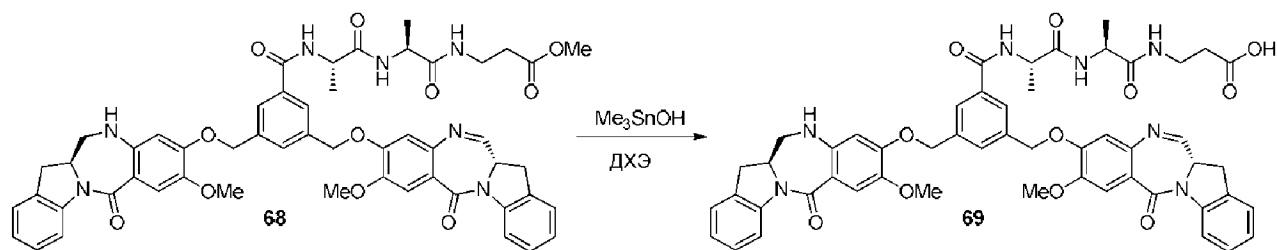
1,12 (д, 3H, $J = 6,9$ Гц).



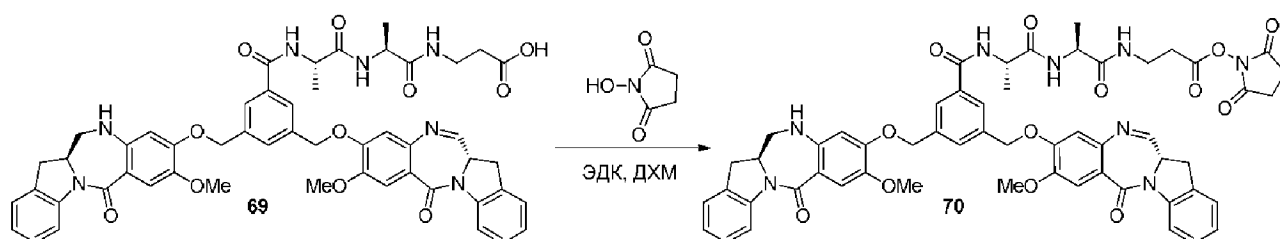
[374] Стадия 3: Соединение **67** получали так же, как и **60** в Примере 7. Соединение **67** получили в виде желтого твердого вещества после флэш-хроматографии на силикагеле (69 мг, 53% выход). ЖХМС = 4,843 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 962,25 (M+H).



[375] Стадия 4: Соединение **68** получали так же, как и соединение **12** в Примере 1. Соединение **68** было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (11,5 мг, 19% выход). ЖХМС = 5,136 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 964,35 (M+H).

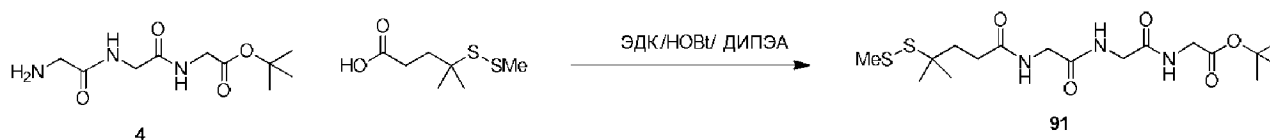


[376] Стадия 5: Соединение **69** получали так же, как и соединение **22** в Примере 2. Сырое соединение **69** было получено в виде желтого твердого вещества после силикагелевой очистки (13 мг, 100% выход). ЖХМС = 5,640 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 950,4 (M+H).

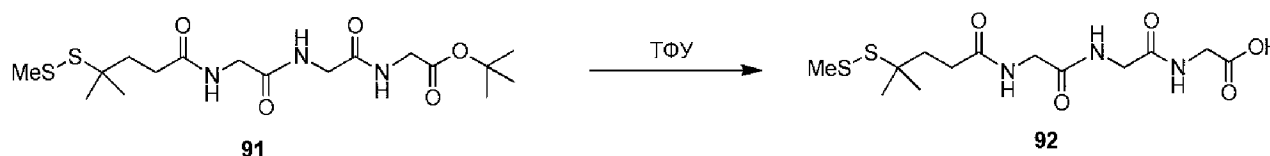


[377] Стадия 6: Соединение **70** получали так же, как и соединение **14** в Примере 1. 2,5-диоксопирролидин-1-ил-3-((S)-2-((S)-2-(3-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4] диазепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-12а,13-дигидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)бензамидо)пропанамидо)пропанамидо)пропаноат, соединение **70** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (5 мг, 35% выход). ЖХМС = 6,138 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ⁺): 1047,4 (M+H).

Пример 9. Синтез (12S,12аS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-меркапто-4-метилпентанамидо)ацетамидо)ацетамидо)ацетамидо)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4] диазепино[1,2-а]индол-9-ил)окси)метил)бензил)окси)-8-метокси-6-оксо-11,12,12а,13-тетрагидро-6Н-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-а]индол-12-сульфоновой кислоты (соединение **98**)

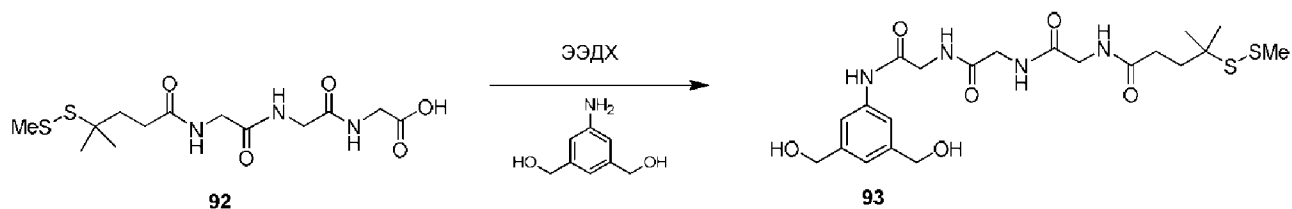


Стадия 1: Соединение **4** (2,0 г, 8,15 ммоль) и 4-метил-4-(метилдисульфанил)пентановую кислоту (1,743 г, 8,97 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (27,2 мл). ЭДЖ·НСl (1,719 г, 8,97 ммоль) и ГОБт (1,249 г, 8,15 ммоль) добавляли, с последующим добавлением ДИПЭА (2,85 мл, 16,31 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном/метанолом (5:1) и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Сырое масло обезвоживали азеотропной перегонкой с ацетонитрилом (3х), затем сушили под высоким вакуумом при 35 °С около 1,5 часов, чтобы получить соединение **91**, которое использовали в следующей стадии без дальнейшей очистки. (3,44 г, 100% выход). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6): δ 8,18-8,09 (м, 3Н), 3,76-3,68 (м, 6Н), 2,41 (с, 3Н), 2,28-2,21 (м, 2Н), 1,84-1,77 (м, 2Н), 1,41 (с, 9Н), 1,25 (с, 6Н).

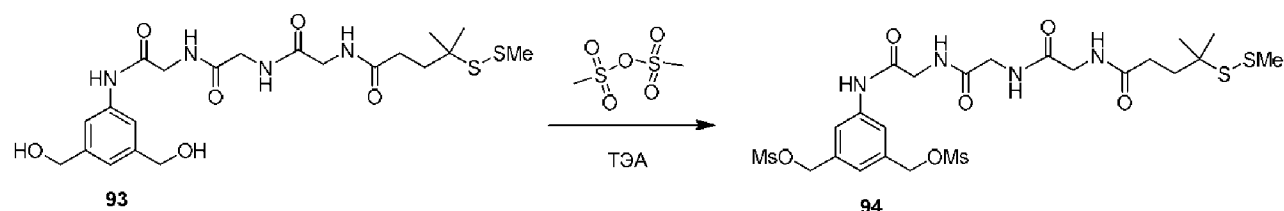


[378] Стадия 2: Соединение **91** (3,44 г, 8,15 ммоль) перемешивали в ТФУ (12,56 мл, 163 ммоль) и деионизированной воде (0,65мл) при кт на протяжении 3,5 часов. Реакционную

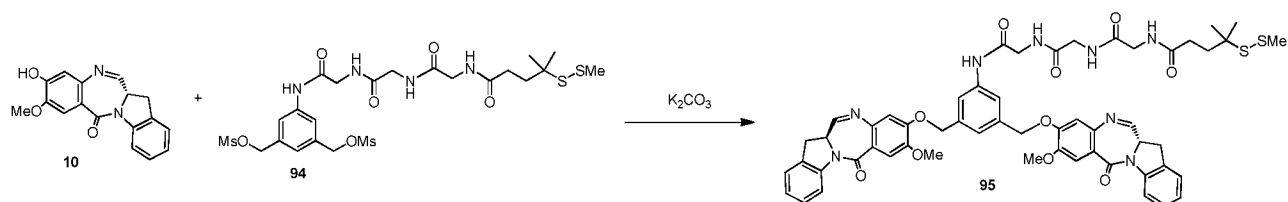
смесь разбавляют ацетонитрилом и упаривают досуха. Сырое твердое вещество суспендировали с этилацетатом, фильтровали и промывали этилацетатом, а затем дихлорметан/метанолом (1:1), чтобы получить соединение **92** (2,98 г, 100% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6): δ 8,19-8,08 (м, 3H), 3,80-3,68 (м, 6H), 2,41 (с, 3H), 2,28-2,20 (м, 2H), 1,85-1,76 (м, 2H), 1,25 (с, 6H).



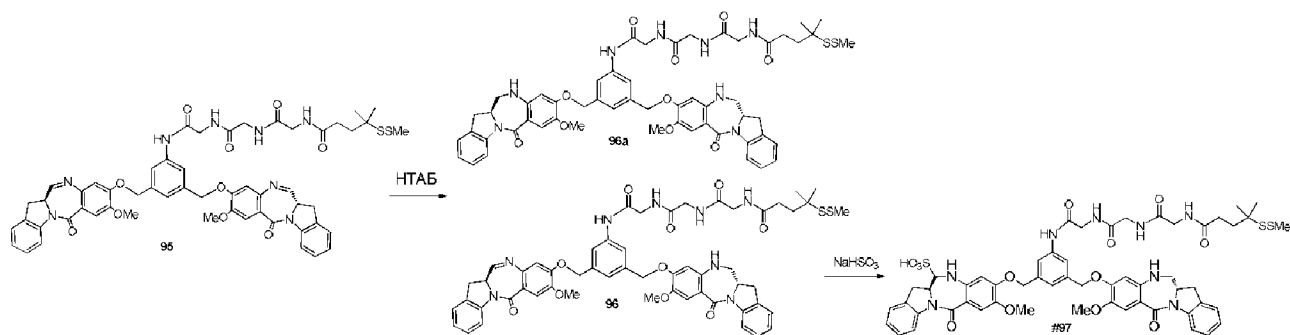
[379] Стадия 3: Соединение **92** (1,74 г, 4,76 ммоль) растворяли в дихлорметане (30,2 мл) и метаноле (15,11 мл). N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (2,243 г, 9,07 ммоль) и (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (0,695 г, 4,53 ммоль) добавляли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель удаляли и добавляли этилацетат. Твердое вещество фильтровали через целит и промывали этилацетатом, а затем метанолом. Фильтрат упаривали и очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/Метанол), чтобы получить соединение **93** (569 мг, 25% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6): δ 9,74 (с, 1H), 8,24-8,15 (м, 3H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, $J = 5,6$ Гц), 4,45 (д, 4H, $J = 5,6$ Гц), 3,87 (д, 2H, $J = 6,0$ Гц), 3,77 (д, 2H, $J = 6,0$ Гц), 3,73 (д, 2H, $J = 5,6$ Гц), 2,40 (с, 3H), 2,28-2,21 (м, 2H), 1,83 -1,76 (м, 2H), 1,24 (с, 6H).



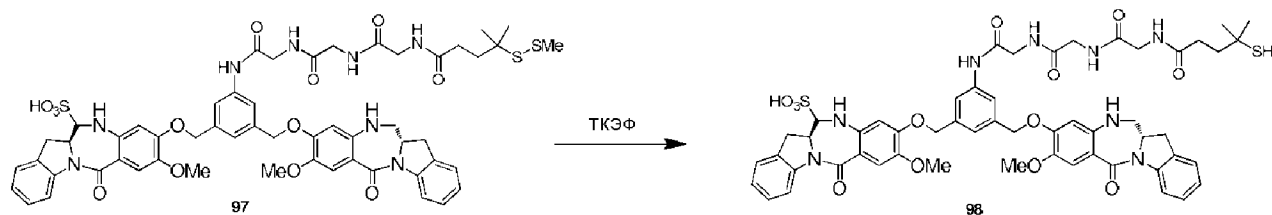
[380] Стадия 4: Соединение **93** (305 мг, 0,609 ммоль) суспендировали в безводном ДХМ (5,992 мл), безводный ДМФА добавляли до достижения гомогенности раствора (~2,5 мл). Раствор охлаждали до -10°C на бане ацетон/сухой лед. Триэтиламин (0,425 мл, 3,05 ммоль) добавляли, с последующим добавлением метансульфонового ангидрида (274 мг, 1,523 ммоль). Смесь перемешивали при -10°C на протяжении 1 часа. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали холодным этилацетат/метанолом (20:1). Органический слой промывали ледяной водой и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой материал сушили под высоким вакуумом, чтобы получить соединение **94** (380 мг, 95% выход). ЖХМС = 4,2 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 655,0 ($M-1$) $^-$.



[381] Стадия 5: Соединение **95** получали так же, как и соединение **57** в Примере 7. Сырое твердое вещество растворяли в смеси дихлорметан / метанол (10: 1), промывали водой и органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли *in vacuo* и очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол) чтобы получить соединение **95** (445 мг, 42% выход, 54% чистота). ЖХМС = 6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1053,4 (M + 1)⁺ и 1051,3 (M - 1)⁻.

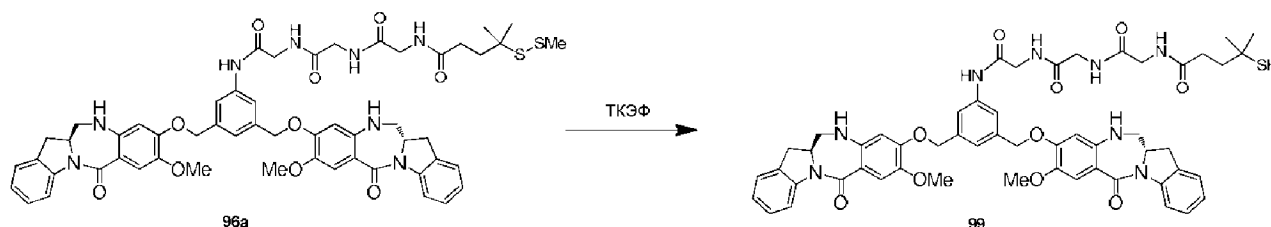


[382] Стадия 6: Соединение **95** (445 мг, 0,423 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтане (2,82 мл). Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (80 мг, 0,359 ммоль) при кт и перемешивали на протяжении 1 ч. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и затем промывали насыщенным хлоридом аммония. Органический слой промывали соевым раствором и сушили, чтобы получить смесь соединений **95**, **96**, и **96a** (496 мг). Эту сырую смесь растворяли в 2-пропаноле (39,17 мл) и воде (19,59 мл). Бисульфит натрия (245 мг, 2,35 ммоль) добавляли и перемешивали при кт 3,5 часа. Смесь заморозили и лиофилизировали, чтобы получить пушистое белое вещество, очищаемое ОФВЭЖХ (C18, ацетонитрил/вода), чтобы получить соединение **97** (54 мг, 10% выход) и соединение **96a** (24 мг, 5% выход). ЖХМС (соединение **97**) = 4,83 мин (15-минутный метод) и ЖХМС (соединение **96a**) = 8,05 мин (15-минутный метод).



[383] **Стадия 7:** К перемешиваемому раствору соединения **97** (54 мг, 0,047 ммоль) в CH_3CN (3,85 мл) добавляли свежеприготовленный буферный раствор ТКЭФ/рН 6,5 (ТКЭФ·НСI (46,7 мг) растворяли в нескольких каплях деионизированной воды, с последующим добавлением по каплям насыщенного бикарбоната натрия до рН ~ 6,5. Раствор разбавляли 0,55 мл рН=6,5, 1 М буферного раствора фосфата натрия) и метанола (2,75 мл). Смесь перемешивали при кт 3 часа и затем замораживали и лиофилизировали. Твердое вещество очищали ОФВЭЖХ (С18, ацетонитрил/ вода), чтобы получить (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-меркапто-4-метилпентанамидо)ацетида)ацетида)ацетида)-5-(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4] диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)бензил)окси)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-a]индол-12-сульфоновую кислоту, соединение **98** (2 мг, 4% выход). ЖХМС = 4,32 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1089,3 (M -1)⁻.

Пример 10. Синтез N-(2-((2-((2-((3,5-бис(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-4-меркапто-4-метилпентанамида (соединение **99**)



[384] Соединение **99** получали так же, как и **98** в Примере 9. N-(2-((2-((2-((3,5-бис(((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]дiazепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-4-меркапто-4-метилпентанамида, соединение **99** было получено в виде белого твердого вещества после очистки С18 (6,3 мг, 27% выход). ЖХМС = 7,26 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1033,5 (M +Na)⁺.

Пример 11. Получение huMOV19-14

[385] Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 8 молярных эквивалентов соединения **14** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-

этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 часов при 25 °С.

[386] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 250 мМ глицина, 10 мМ гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 20 часов при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20000 MWCO).

[387] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 3,0 молекул IGN91, связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **14**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 90% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгировавшего соединения **14** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 0,78 мг/мл. Анализом гель-чипов было установлено, что >87% сконъюгированного антитела не повреждено. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7А.

Пример 12. Получение huMOV19-сульфо-SPDB-98

[388] Смесь *in situ*, содержащую конечные концентрации 3,9 мМ соединения **98** и 3 мМ сульфо-SPDB линкера в ДМА, содержащем 10 мМ *N,N*-диизопропилэтиламина (ДИПЭА), инкубировали на протяжении 60 мин перед добавлением 20-кратного избытка полученного соединения **98**-сульфо-SPDB-NHS к реакционной смеси, содержащей 4 мг/мл антитела huMOV19 в 15 мМ HEPES pH 8,5 (90:10 вода:ДМА). Раствору позволили сконъюгировать на протяжении ночи при 25 °С.

[389] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 100 мМ аргинина, 20 мМ гистидина, 2% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение ночи при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

[390] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 3,7 молекул соединения **98**, связанных на антитело (методом SEC с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **98**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 99% мономера (с помощью эксклюзионной

хроматографии), и конечную концентрация белка 0,18 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7А.

Пример 13. Получение huMOV19-35

[391] Реакционной смеси, содержащей 2,5 мг/мл антитела huMOV19 и 5 молярных эквивалентов соединения **35** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 часов при 25 °С.

[392] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 250 мМ глицина, 10 мМ гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 8 часов при кт с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

[393] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,9 молекул соединения **35**, связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для IGN128, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 97% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <1% несконъюгировавшего соединения **35** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,4 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7А.

Пример 14. Получение huMOV19-63

[394] [Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 7 молярных эквивалентов соединения **63** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 часов при 25 °С.

[395] После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 250 мМ глицина, 10 мМ гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA

Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 20 часов при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20000 MWCO).

[396] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,7 молекул соединения **63** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для IGN131, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для антитела huMOV19), 99% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгировавшего соединения **63** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,6 мг/мл. Анализом гель-чипов было установлено, что >90% сконъюгированного антитела не повреждено. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7В.

Пример 15. Получение huMOV19-80

[397] Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 7 молярных эквивалентов соединения **80** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 часов при 25 °С.

[398] После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 250 mM глицина, 10 mM гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 20 часов при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20000 MWCO).

[399] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,5 молекул соединения **80** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для соединения **80**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для антитела huMOV19), 99% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгировавшего соединения **80** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 2,4 мг/мл. Анализом гель-чипов было установлено, что >90% сконъюгированного антитела не повреждено.

Пример 16. Получение huMOV19-90

[400] Реакционную смесь, содержащую 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 3,9 молярных эквивалентов соединения **90** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 95:15 ДМА:50 мМ сукцинат рН 5,5 в течение 4 часов при 25 °С) в 15 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) рН 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, инкубировали 4 часа при 25 °С. После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 10 мМ сукцината, 50 мМ натрий хлорида, 8,5% масс./об. сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ натрия бисульфита, рН 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 4 часов при кт и затем в течение ночи при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 30000 MWCO).

[401] В очищенном конъюгате обнаружили конечную концентрацию белка 1,8 мг/мл и в среднем 2,7 молекул соединения **90** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для IGN152, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19); 98,3% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии); и <1,1% несконъюгировавшего соединения **90** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом). Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7В.

Пример 17. Получение huMOV19-49

[402] Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 5 молярных эквивалентов соединения **49** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) рН 8,5 буфер и 10% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 4 часа при 25 °С.

[403] После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 250 мМ глицина, 10 мМ гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ натрия бисульфита, рН 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 4 часов при кт с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20000 MWCO).

[404] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,8 молекул соединения **49** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **49**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} =$

201400 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 94% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгированного соединения **49** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,5 мг/мл. Анализом гель-чипов было установлено, что >95% сконъюгированного антитела не повреждено. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7С.

Пример 18. Получение huMOV19-сульфо-SPDB-99

[405] Смесь *in situ*, содержащую конечные концентрации 1,95 мМ соединения **99** и 1,5 мМ сульфо-SPDB линкера в ДМА содержащем 10 мМ *N,N*-диизопропилэтиламина (ДИПЭА), инкубировали на протяжении 20 мин перед покрытием 4 мМ малеимидопропионовой кислоты МПК. 6-кратный избыток полученного **99**-сульфо-SPDB-NHS добавляли к реакционной смеси, содержащей 2,5 мг/мл huMOV19 антитела в 15 мМ HEPES pH 8,5 (82:18 воде: ДМА). Раствору позволили сконъюгировать на протяжении ночи при 25 °С.

[406] После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 20 мМ гистидина, 50 мМ натрий хлорида, 8,5% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение ночи при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

[407] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 1,6 молекул соединения **99** связанных на антитело (методом UV/Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **99**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 99% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), и конечную концентрацию белка 0,59 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7С.

Пример 19. Получение huMOV19-70

[408] Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 5 молярных эквивалентов соединения **70** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 10% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 4 часа при 25 °С.

[409] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 20 mM гистидина, 100 mM аргинина, 2% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). После очистки диализ проводили в том же буфере в течение 18 часов при 4 °C с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20000 MWCO).

[410] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 3,0 молекул соединения **70** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **70**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 94% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), < 0,1% несконъюгировавшего соединения **70** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,3 мг/мл.

Пример 20. Получение huMOV19-23

[411] Реакционной смеси, содержащей 2,5 мг/мл антитела huMOV19 и 4 молярных эквивалентов соединения **23** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (*N,N*-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 часов при 25 °C.

[412] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 250 mM глицина, 10 mM гистидина, 1% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 8 часов при кт с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

[413] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,8 молекул соединения **23** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **23**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 98% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), < 3% несконъюгировавшего соединения **23** (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,3 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 7D.

Пример 21. Исследование аффинности конъюгатов методом проточной цитометрии huMOV19-14, huMOV19-90 и huMOV19-107

[414] 100 мкл/лунку конъюгата **huMOV19-14**, **huMOV19-90** или **huMOV19-107** или антитела huMOV19 разводили в буфере FACS (1% BSA, 1x PBS) на 96-луночном планшете (Falcon, круглодонный) в начальной концентрации 3×10^{-8} М по два раза и серийно разводили 3-кратно в буфере FACS при 4 °С. Клетки T47D (опухоль молочной железы человека), выращенные в среде RPMI-1640 (Life Technologies) с добавлением термоинактивированной 10% FBS (Life Technologies), 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) и 0,2 ЕД бычьего инсулина/мл (Sigma), промывали один раз в PBS и отбирали с помощью версена (Life Technologies). Клетки T47D ресуспендировали в питательной среде (см. выше), чтобы нейтрализовать действие версена, и подсчитывали на счетчике Coulter. Затем клетки дважды промывали в холодном буфере FACS, центрифугировали между промывками при 1200 об/мин в течение 5 мин. 100 мкл/мл 2×10^4 клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат, антитело или только буфер FACS, и инкубировали при 4 °С в течение 2 часов. После инкубации клетки центрифугировали, как описано выше, и промывали один раз в 200 мкл / лунку холодного буфера FACS. Затем клетки окрашивали 200 мкл / лунку FITC-конъюгированных козьих антител против человеческого IgG,-Fcγ вторичного антитела (контроли включали неокрашенные клетки и те, которые окрашивали только вторичным антителом) в течение 40 мин при температуре 4 °С, центрифугировали и промывали один раз в 200 мкл / лунку холодным PBS-D. Клетки фиксировали в 200 мкл / лунку 1% формальдегида / PBS-D и хранили при 4 °С. После хранения, окрашивание поверхности клеток конъюгатом или антителом детектируют с помощью проточной цитометрии на FACS Calibur (BD Biosciences). Геометрические средства наносили в виде зависимости от логарифма концентрации конъюгата или антитела с использованием GraphPad Prism и EC_{50} вычисляли с помощью нелинейного 4-параметрического логистического регрессионного анализа.

[415] Анализ связывания повторили для конъюгата huMOV19-90, и данные показаны на ФИГ. 15В.

[416] Как показано на ФИГ. 1, ФИГ. 15А, ФИГ. 15В и ФИГ. 20, конъюгаты связываются с поверхностью клеток T47D, экспрессирующих антиген-мишень, аналогично неконъюгированному антителу в проточной цитометрии, тем самым демонстрируя, что связывание не зависит от процесса конъюгации.

Пример 22. Анализ цитотоксичности конъюгата huMOV19-14

[417] 100 мкл / лунку конъюгата **huMOV19-14** разводили в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) в 96-луночный планшет (Corning, плоское дно) при исходных концентрациях $3,5 \times 10^{-9}$ М до $3,5 \times 10^{-8}$ М в трех экземплярах и серийно разводили в 3- раза в вышеупомянутых средах при температуре окружающей среды. KB клетки (буккальная эпителиальная опухоль), выращиваемые в EMEM (ATCC), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг / мл гентамицина (Life Technologies), промывали один раз в PBS и отбирали с 0,05% трипсин-ЭДТА (Life Technologies). Клетки KB ресуспендировали в питательной среде (см. выше), чтобы нейтрализовать действие трипсина, и подсчитывали на счетчике Coulter. 100 мкл / мл 1×10^3 клеток / лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и инкубировали в 37° инкубаторе с 5% CO_2 в течение 5 дней с и без 1 мкМ блокирующего анти-FOLR1 антитела (huMOV19). Общий объем 200 мкл/лунку. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 20 мкл / лунку WST-8 (Dojindo) и позволили эффекту развиваться в течение 2 часов. Поглощение считывали на планшет-ридере при 450 и 620 нм. Поглощение при 620 нм вычитали из поглощения при 450 нм. Фон в лунках, содержащих только носитель, дополнительно вычитают из скорректированных значений спектральной поглощательной способности, и подсчитывали в Excel фракцию выживших (SF) необработанных клеток. XY график концентрации ADC (M) по сравнению с SF был создан при помощи Graph Pad Prism.

[418] Как показано на ФИГ. 2, конъюгат является сильнодействующим против клеток KB, при IC_{50} 4×10^{-12} М. Добавление избытка неконъюгированного антитела значительно снижает цитотоксический эффект, демонстрируя антиген-специфичность.

Пример 23. Анализ цитотоксичности при "эффекте свидетелей" конъюгатов huMOV19-14 и huMOV19-90

[419] 100 мкмкл/лунку **huMOV19-14** или **huMOV19-90** разводили в RPMI-1640 (Life Technologies) дополненную термоинактивированной 10% FBS (Life Technologies), 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) и β ME (Life Technologies) на 96-луночном планшете (Falcon, круглодонный) в концентрациях от $1 \text{ e-}10$ М до $4 \text{ e-}10$ М в шестикратном повторении. 300,19 клетки (мышинные), экспрессирующие рекомбинантный FOLR1 (FR1 # 14) или без экспрессионного вектора (родительские) подсчитывали на

счетчике Coulter. 50 мкл/мл 1000 FR1 # 14 клеток / лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, 50 мкл/ мл 2000 родительских клеток / лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и как FR1 # 14 так и родительские клетки были добавлены вместе в лунки, содержащие конъюгат или только среду. Все планшеты инкубировали в 37 °С инкубаторе с 5% CO₂ в течение 4 дней. Общий объем был 150 мкл/лунку. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 75 мкл / лунку Cell Titer Glo (Promega) и позволили эффекту развиваться в течение 45 мин. Люминесценцию определяли на люминометре и фон в лунках, содержащих только носитель, вычитали из всех значений. Гистограмма усредненных значений каждой обработки клеток была сделана с помощью Graph Pad Prism.

[420] Как показано на ФИГ. 3, конъюгат **huMOV19-14** оказывает слабый цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

[421] Как показано на ФИГ. 13, конъюгат **huMov19-90** оказывает сильный цитотоксический эффект на соседние антиген-негативные клетки.

Пример 24. *In vitro* анализ цитотоксичности конъюгата huMy9-6-14

[422] Разведения конъюгатов добавляли в лунки 96-луночных планшетов, содержащих от 2×10^3 до 1×10^4 клеток на лунку в соответствующей ростовой среде. Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых соединений, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Чашки инкубировали в течение четырех-шести дней при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 6% CO₂. WST-8 реагент, 10% об./об., (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD), затем добавляли в лунки, и планшеты инкубировали при 37 °С в течение от 2 до 6 ч. Затем измеряли поглощение на планшет-ридере спектрофотометре в режиме двойной длины волны 450 нм / 650 нм, и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали. Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения, и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками).

[423] Как показано на ФИГ. 3, конъюгат обладает высокой эффективностью против различных антиген-позитивных клеток рака; в то время как антиген-отрицательные клетки L-540 остаются жизнеспособными при воздействии того же конъюгата.

Пример 25. Анализ цитотоксичности при "эффекте свидетелей" конъюгата huMy9-6-14

[424] Для определения концентрации **huMy9-6-14** были проведены предварительные тесты, он не был цитотоксичным по отношению к антиген-негативным клеткам RADA-1, но убил все антиген-позитивные клетки KARA. RADA-1 (500 клеток/лунку) и KARA (500, 1000, 2000, 4000 клеток/лунку) были посеяны на 96-луночные круглодонные планшеты. Разведения **huMy9-6-14** готовили в среде для культивирования клеток (среда RPMI1640, дополненная 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки и 50 мг / л гентамицина) и добавляли к клеткам. Планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37 °С, и жизнеспособность клеток в каждой лунке определяли, используя WST-8 реагент (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Для проверки силы "эффекта свидетеля", вызванного конъюгатами, клетки RADA-1 и KARA смешивали в разных пропорциях (500 RADA-1 клеток без KARA клеток; 500 RADA-1 клеток плюс 500 KARA клеток; 500 RADA-1 клеток плюс 1000 KARA клеток; 500 RADA-1 клеток плюс 2000 KARA клеток; 500 RADA-1 клеток плюс 4000 KARA клеток), и сеяли на 96-луночные круглодонные планшеты. Затем в смеси клеток добавляли 1,0e-9M или 5,0e-10M **huMy9-6-14** - концентрации, которые не были цитотоксичными для RADA-1 клеток но убили все KARA клетки. Планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37 °С, и жизнеспособность клеток RADA-1 в каждой лунке определяли, используя WST-8 реагент (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Затем измеряли поглощение на планшет-ридере спектрофотометре в режиме двойной длины волны 450 нм / 650 нм, и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали.

[425] Как показано на ФИГ. 5, конъюгат оказывает цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

Пример 26. Противоопухолевая активность отдельных доз huMOV19-80 и huMOV19-90 против NCI-H2110 НКРЛ-ксенотрансплантатов у самок мышей с ТКИД

[426] Самки мышей CB,17 SCID, возрастом 6 недель, были получены от Charles River Laboratories. Мышей инокулировали 1×10^7 NCI-H2110 опухолевых клеток, суспендированных в 0,1 мл 50% Матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок. Когда объемы опухоли достигал примерно 100 мм³ (7-й день после инокуляции), животные были рандомизированы в зависимости от объема опухоли

на 5 групп по 6 мышей в каждой. Мыши получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл / мышь), **huMOV19-80** или **huMOV19-90** при 5 и 25 мкг / кг на основе концентрации **huMOV19-80** или **huMOV19-90** на 1 день (8-й день после инокуляции). **huMOV19** является гуманизированным моноклональным антителом, селективно связывающимся с фолатным рецептором 1 (FOLR1).

[427] Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в мм³ выражали, используя формулу $V = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times \frac{1}{2}$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog. Ингибирование роста опухоли (Т / С величина) определяли с помощью следующей формулы:

$T/C (\%) = \text{Медианный объем опухоли обрабатываемых} / \text{Медианный объем опухоли контроля} \times 100$.

[428] Объем опухоли определяли одновременно для обработанных (Т) и контрольных (С) групп, когда объем опухоли контроля достиг заданного размера 1000 мм³. Суточный средний объем опухоли каждой обработанной группы определяли в том числе у мышей без опухолей (0 мм³). В соответствии со стандартами NCI, $T / C \leq 42\%$ - минимальный уровень противоопухолевой активности. $T / C < 10\%$ считается высоким уровнем противоопухолевой активности.

[429] Как показано на рис. 6, конъюгат **huMOV19-90** обладает высокой активностью в обеих дозах 5 и 25 мкг / кг; в то время как **huMOV19-80** конъюгат обладает высокой активностью при 25 мкг / кг.

Пример 27. Подготовка huML66-90

[430] Реакционную смесь, содержащую 2,0 мг/мл антитела huML66, антитело против EGFR (см. WO 2012/058592, включенную посредством ссылки), и 3,5 молярных эквивалентов соединения **90** (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:50 мМ сукцинат рН 5,5 в течение 4 часов при 25 °С) в 15 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) рН 8,5 буфер и 10% об./об. ДМА (N,N-диметилацетамид) совместного растворителя, инкубировали 4 часа при 25 °С. После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 20 мМ гистидина, 50 мМ натрий хлорида, 8,5 масс./об.% сахарозы, 0,01% твина-20, 50

мкМ натрия бисульфита, рН 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 4 часов при кт и затем в течение ночи при 4 °С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 30000 MWCO).

[431] В очищенном конъюгате обнаружили конечную концентрация белка 0,9 мг/мл и в среднем 2,7 молекул соединения **90** связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15280 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для соединения **90**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 205520 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ для антитела huML66); 99,1% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии); и <1% несконъюгированного IGN149 (двойная колонка, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом). Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 8.

Пример 28. *In vitro* цитотоксические исследования конъюгата huML66-90

[432] Способность конъюгата **huML66-90** ингибировать рост клеток измеряли путем цитотоксических исследований *in vitro*. Клетки-мишени высевали в количестве 1-2000 клеток на лунку в 100 мкл полной среды RPMI (RPMI-1640, 10% сыворотки крови эмбрионов коров, 2 мМ глутамин, 1% пенициллина-стрептомицина, все реагенты от Invitrogen). Антитела разводили в полной среде RPMI с использованием 3-кратных серийных разведений и добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Конечная концентрация, как правило, находилась в диапазоне от $3 \times 10^{-8} \text{ М}$ до $4,6 \times 10^{-12} \text{ М}$. Клетки инкубировали при 37°C в увлажненном 5% CO₂-инкубаторе в течение 5-6 дней. Жизнеспособность оставшихся клеток определяли с помощью колориметрического анализа с WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US). В живых клетках WST-8 восстанавливается дегидрогеназами до оранжевого продукта формазана, который растворим в тканевой культуральной среде. Количество произведенного формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. WST-8 добавляли к 10% от конечного объема и инкубировали планшеты при 37°C в увлажненном 5% CO₂ инкубаторе в течение дополнительных 2-4 часов. Планшеты анализировали, измеряя поглощение при 450 нм (A₄₅₀) на многолуночковом планшет-ридере. Фоновое поглощение A₄₅₀ лунок, содержащих только среду и WST-8, вычитали из всех значений. Жизнеспособность в процентах рассчитывали делением значения каждого обработанного образца на среднее значение лунок с необработанными клетками. Жизнеспособность в процентах = $100 \times (A_{450} \text{ обработанного образца} - A_{450} \text{ фона}) / (A_{450} \text{ необработанного образца} - A_{450} \text{ фона})$. Значения жизнеспособности в процентах наносили на график в зависимости от

концентрации антител в полулогарифмическом масштабе для каждой обработки. Кривые доза-ответ генерировали нелинейной регрессией и значение EC₅₀ каждой кривой рассчитывали с помощью GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA).

Цитотоксическая активность *in vitro*

[433] Цитотоксичность *in vitro* конъюгата **huML66-90** оценивали в присутствии и в отсутствие избытка неконъюгированного антитела, а также по сравнению с активностью неспецифического конъюгата **huIgG-90** в EGFR-экспрессирующих клетках, а результаты типичного анализа цитотоксичности показаны на ФИГ. 9. Конъюгат **huML66-90** привел к специфической гибели клеток Detroit-562 SCC-HN при значении EC₅₀ 16 пМ. Наличие избытка неконъюгированного антитела значительно понижало активность и приводило к значению EC₅₀ приблизительно 2 нМ. Аналогично, конъюгат **huIgG-90** вместе с несвязывающим контрольным антителом huIgG приводил к гибели клеток со значением EC₅₀ приблизительно 8 нМ.

[434] Аналогичным образом конъюгат **huML66-90** привел к специфической гибели клеток NCI-H292 НКРЛ при значении EC₅₀ 12 пМ. Наличие избытка неконъюгированного антитела значительно понижало активность и приводило к значению EC₅₀ приблизительно 2 нМ. Аналогично, конъюгат **huIgG-90** вместе с несвязывающим контрольным антителом huIgG приводил к гибели клеток со значением EC₅₀ приблизительно 8 нМ.

[435] Аналогично наблюдалась специфическая гибель клеток NCI-H1703.

Таблица 1.

Конъюгат	Detroit EC ₅₀ в пМ	NCI-H292 EC ₅₀ в пМ	NCI-H1703 EC ₅₀ в пМ
huML66-90	16	12	20
huML66-90 +блок	2350	1570	2140
huIgG-90 контроль	8350	8350	Н/Д

Пример 29. Цитотоксическая активность *in vitro* huMOV19-90

[436] 100 мкл/лунку конъюгата **huMOV19-90** разводили в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) в 96-луночный планшет (Corning, плоскодонный) при исходных концентрациях от 3,5e-9 М до 3,5 e-8 М в трех экземплярах и серийно разводили в 3- раза в вышеупомянутых средах при температуре окружающей

среды. KB клетки (буккальная эпителиальная опухоль), выращиваемые в EMEM (ATCC), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг / мл гентамицина (Life Technologies), промывали один раз PBS и отбирали с 0,05% трипсин-ЭДТА (Life Technologies). Другими протестированными клетками были NCI-H2110 (НМКРЛ) и T47D (эпителий молочной железы), выращиваемые в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной термоинактивированной 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies). Среда для T47D также была дополнена 0,2 МЕ/мл бычьего инсулина. Все клетки ресуспендировали в питательной среде (см. выше), чтобы нейтрализовать действие трипсина, и подсчитывали на гемоцитометре. 100 мкл/мл 1000 KB клеток/лунку или 2000 T47D и NCI-H2110 клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и инкубировали в 37 °C инкубаторе с 5% CO₂ в течение 5 дней с и без 1 мкМ блокирующего антитела против FOLR1 (huMOV19). Общий объем составляет 200 мкл/лунку. Начальная концентрация каждого конъюгата на клетках KB была 3,5e-9 М, а для клеток T47D и NCI-H2110, начальная концентрация каждого конъюгата была 3,5e-8 М. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 20 мкл/лунку WST-8 (Dojindo) и позволили эффекту развиваться в течение 2 часов. Поглощение считывали на планшет-ридере при 450 и 620 нм. Поглощение при 620 нм вычитали из поглощения при 450 нм. Фон в лунках, содержащих только носитель, дополнительно вычитают из скорректированных значений спектральной поглощательной способности, и подсчитывали в Excel фракцию выживших (SF) необработанных клеток. XY график концентрации ADC (M) по отношению к SF был создан при помощи Graph Pad Prism.

[437] Как показано на ФИГ. 10-12 и в Таблице 2, конъюгат **huMOV19-90** высокоэффективен против клеток KB, T47D и NCI-H2110. Добавление избытка неконъюгированного антитела значительно снижает цитотоксический эффект, демонстрируя антиген-специфичность.

Таблица 2.

	KB		NCI-H2110		T47D	
	-блок	+блок	-блок	+блок	-блок	+блок
IC ₅₀	4e-12 М	8e-10 М	2e-11 М	1e-8 М	3e-11 М	8e-9 М

В другом эксперименте способность конъюгатов ингибировать рост клеток измеряли с использованием *in vitro* анализа на цитотоксичность на основе WST-8. Клетки в 96-луночных планшетах (как правило, 1×10^3 на лунку) обрабатывали конъюгатом в различных концентрациях в подходящей среде для культивирования клеток общим объемом 0,2 мл. Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых соединений, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Планшеты инкубировали в течение четырех-шести дней при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 6% CO₂. Реагент WST-8 (10% об./об.; Dojindo Molecular Technologies) затем добавляли в лунки, и планшеты инкубировали при 37 °C в течение от 2 до 6 часов в зависимости от клеточной линии. Затем измеряли поглощение на спектрофотометре-планшет-ридере в режиме двойной длины волны 450 нм/650 нм, и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали. Полученные значения OD₄₅₀ были использованы для расчета видимой уцелевшей фракции клеток с использованием GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA). Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения, и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками). Кривые доза-ответ получали с помощью нелинейной регрессии с использованием сигмовидного подбора кривой с переменным наклоном в Graph Pad Prism. IC₅₀ (ингибирующая концентрация 50%) генерировалась программным обеспечением.

Конъюгаты были активны в отношении протестированных клеточных линий Ishikawa (рак эндометрия), KB (рак шейки матки) и NCI-H2110 (немелкоклеточный рак легкого), как показано на ФИГ. 21 и в Таблице 3. Активность уничтожения клеток была FOLR1-зависимой, так как избыток немодифицированного антитела huMOV19 (1 мкМ) заметно снижал эффективность конъюгата (в от 20 до 200 раз).

Таблица 3.

Клеточная линия	IC ₅₀ , нМ			
	huMOV19-90		huMOV19-107	
	Конъюгат	Конъюгат +немодифицированное антитело	Конъюгат	Конъюгат +немодифицированное антитело
Ishikawa	0,05	1,0	0,05	2,0
KB	0,005	1,0	0,005	0,8
NCI-H2110	0,1	4,0	0,1	7,0

Пример 30. Противоопухолевая активность отдельных доз конъюгата huMOV19-90 против NCI-H2110 НКРЛ-ксенотрансплантатов у самок мышей с ТКИД

[438] Самки мышей CB,17 SCID, возрастом 6 недель, были получены от Charles River Laboratories. Мышей инокулировали 1 x 10⁷ NCI-H2110 опухолевых клеток, суспендированных в 0,1 мл 50% Матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок. Когда объемы опухоли достигал примерно 100 мм³ (7-й день после инокуляции), животные были рандомизированы в зависимости от объема опухоли на 4 группы по 6 мышей в каждой. Мыши получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь), или **huMOV19-90** в дозах 1, 3 или 5 мкг/кг на основе концентрации соединения **90** на 1 день (8-й день после инокуляции).

[439] Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в мм³ выражали, используя формулу $V = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times \frac{1}{2}$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

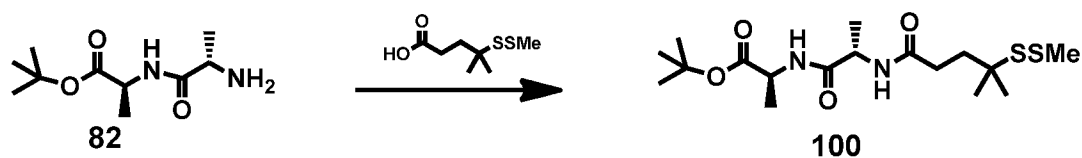
[440] Ингибирование роста опухоли (Т / С величина) определяли с помощью следующей формулы:

$$T/C \quad (\%) = \frac{\text{Медианный объем опухоли обрабатываемых}}{\text{Медианный объем опухоли контроля}} \times 100.$$

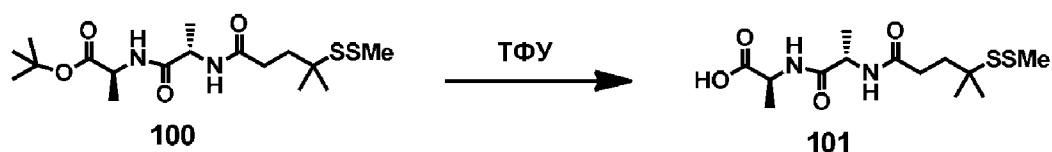
Объем опухоли определяли одновременно для обработанных (Т) и контрольных (С) групп, когда объем опухоли контроля достиг заданного размера 1000 мм³. Суточный средний объем опухоли каждой обработанной группы определяли в том числе у мышей без опухолей (0 мм³). В соответствии со стандартами NCI, $T / C \leq 42\%$ - минимальный уровень противоопухолевой активности. $T / C < 10\%$ считается высоким уровнем противоопухолевой активности.

[441] Как показано на ФИГ. 14, конъюгат **huMOV19-90** активен в дозе 3 мкг/кг и высокоактивен в дозе 5 мкг/кг.

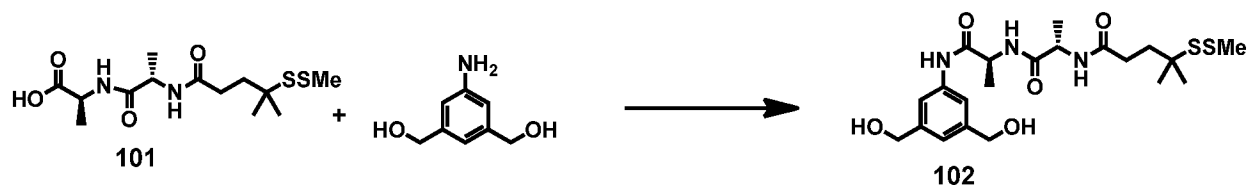
Пример 31. Синтез Соединения 107



[442] Стадия 1: Соединение **82** (500 мг, 2,31 ммоль), 4-метил-4-(метилдисульфонил)пентановой кислоты (449 мг, 2,31 ммоль), ЭДК·НСl (465 мг, 2,43 ммоль), ГОБт (354 мг, 2,31 ммоль), и ДИПЭА (0,81 мл, 4,62 ммоль) растворяли в ДМФ (7,7 мл) и перемешивали на протяжении ночи, пока реакция не закончится. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом и промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия, насыщенным раствором хлорида аммония и дважды водой. Органический слой сушили и концентрировали в вакууме, чтобы получить соединение **100** (875 мг, 96% выход), используемое напрямую в следующей стадии. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ 8,15 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 8,02 (д, 1H, $J = 6,8$ Гц), 4,26-4,33 (м, 1H), 4,03-4,12 (м, 1H), 2,41 (с, 3H), 2,18-2,22 (м, 2H), 1,76-1,80 (м, 2H), 1,39 (с, 9H), 1,24 (с, 6H), 1,24 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц), 1,19 (д, 3H, $J = 7,2$ Гц).

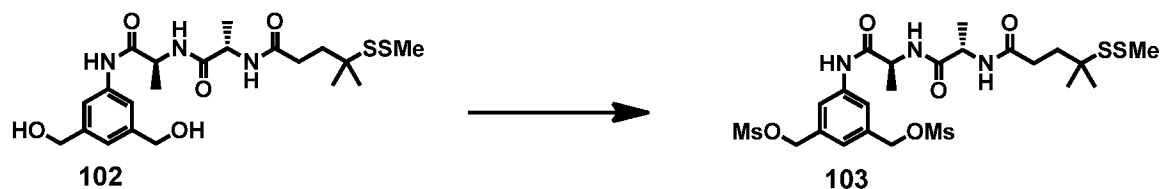


[443] Стадия 2: ТФУ (2,6 мл) и воду (0,17 мл) добавляли к неразбавленному Соединению **100** (875 мг, 2,23 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре до окончания реакции. Реакционную смесь разбавляли и подвергали азеотропной перегонке с ацетонитрилом с получением липкого масла. Затем его разбавили ацетонитрилом и водой, замораживали и лиофилизировали, получая соединение **101** (1 г, выход 100%) в виде почти белого твердого вещества, которое использовали без дополнительной очистки. ЖХМС = 3,99 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 337,0 ($M + 1$) $^+$.

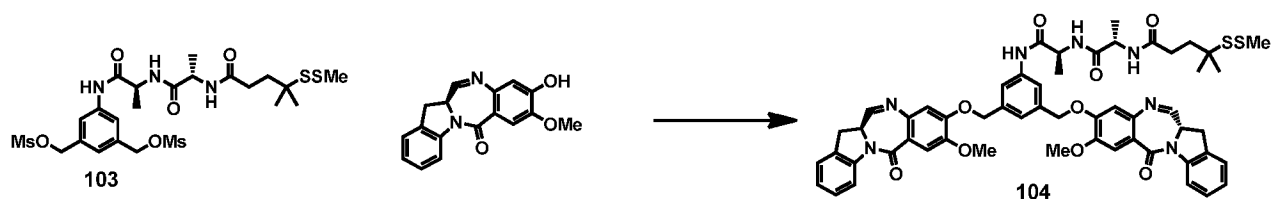


[444] Стадия 3: Соединение **101** (923 мг, 1,65 ммоль) и (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (240 мг, 1,57 ммоль) растворяли в ДМФ (5,2 мл). ЭДК·НСl (601 мг, 3,13 ммоль), и ДМАП (96 мг, 0,78 ммоль) добавляли при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом и промывали водой три раза. Органический слой сушили,

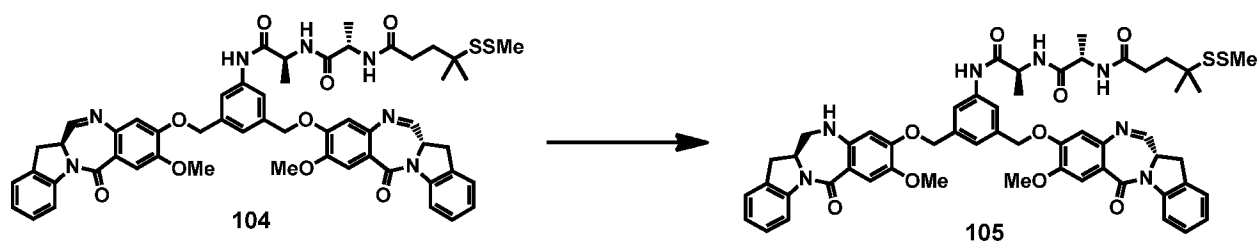
концентрировали в вакууме и очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/MeOH) чтобы получить Соединение **102** (150 мг, 20% выход). ЖХМС = 3,91 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 472,2 (M + 1)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD): δ 9,69 (с, 1H), 8,21 (д, 1H, J = 6,8 Гц), 8,18 (д, 1H, J = 6,8 Гц), 7,52 (с, 2H), 7,12 (с, 1H), 4,58 (с, 4H), 4,44-4,48 (м, 1H), 4,29-4,32 (м, 1H), 3,34 (с, 2H), 2,38 (с, 3H), 2,34-2,40 (м, 2H), 1,90-1,95 (м, 2H), 1,43 (д, 3H, J = 7,2 Гц), 1,36 (д, 3H, J = 7,2 Гц), 1,30 (с, 6H).



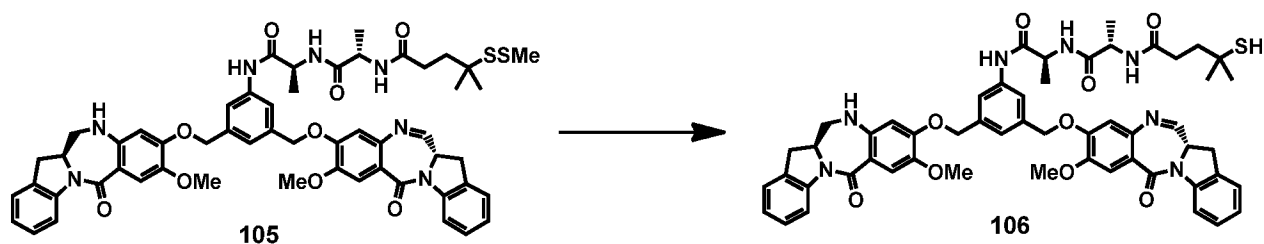
[445] Стадия 4: Соединение **102** готовили так же, как и соединение **94** в Примере 9. Сырой материал сушили под высоким вакуумом, чтобы получить Соединение **103** (174 мг, 101% выход), которое использовали без дополнительной очистки. ЖХМС = 4,95 мин (8-минутный метод).



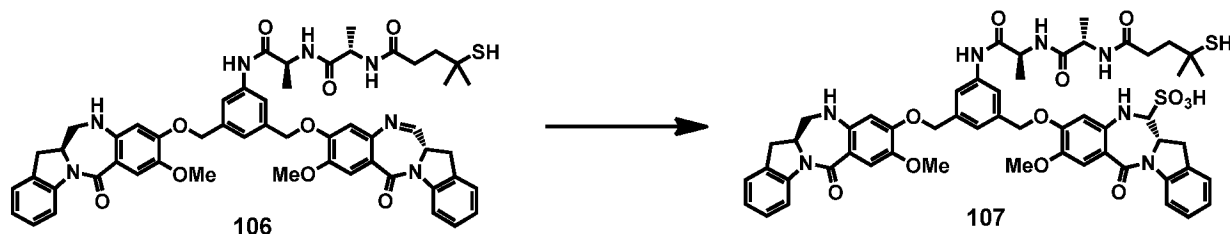
[446] Стадия 5: Соединение **103** готовили так же, как и соединение **57** в Примере 7. Сырое твердое вещество содержало соединение **104** (203 мг, 44% выход, 60% чистота) которое использовали без дополнительной очистки. ЖХМС = 5,68 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1024,3(M + 1)⁺.



[447] Стадия 6: Соединение **104** готовили так же, как и соединение **12** в Примере 1. Неочищенный остаток очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, CH₃CN/H₂O, градиент, 50%-65%), чтобы получить моноиминное соединение **105** в виде твердого вещества (22 мг, 16% выход, 90% чистота). ЖХМС = 6,00 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1027,3(M + 1)⁺.



[448] **Стадия 7:** Соединение **106** растворяли в ТГФ (0,5 мл) и АЦН (0,23 мл) при комнатной температуре. Затем его готовили так же, как и соединение **98** в Примере 9. Смесь перемешивали до завершения реакции, а затем разбавляли ДХМ и ДИ водой. Органический слой промывали солевым раствором, сушили и фильтровали. Фильтрат концентрировали, чтобы получить сырой тиол, соединение **106** (21 мг, 100% выход), которое использовали напрямую в следующей реакции. ЖХМС = 5,67 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 980,4 (M+1)⁺.



[449] **Стадия 8:** Соединение **106** (21 мг, 0,021 ммоль) суспендировали в 2-пропанол (1428 мкл) и воде (714 мкл). Добавляли метабисульфит натрия (22,30 мг, 0,214 ммоль) и реакцию перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Реакционную смесь разбавляли смесью ацетонитрил / вода, замораживали и лиофилизировали. Полученный белый порошок очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, CH₃CN/H₂O, градиент, 20%-40%), и необходимые фракции собирали и лиофилизировали, чтобы получить соединение **107** (5,3 мг, 23% выход). ЖХМС = 5,67 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1060,2 (M - 1)⁻.

Пример 32. Получение конъюгата huMOV19-сульфо-SPDB-107 (или huMOV19-107)

[450] Смесь *in situ*, содержащую конечные концентрации 1,95 мМ соединения **107** и 1,5 мМ сульфо-SPDB линкера в сукцинатном буфере (pH 5): ДМА (30:70) инкубировали на протяжении 6 часов перед добавлением 7-кратного избытка **107**-сульфо-SPDB-NHS к реакционной смеси, содержащей 4 мг/мл антитела huMOV19 в 15 мМ HEPES pH 8,5 (87:13 вода:ДМА). Раствору позволили сконъюгировать на протяжении ночи при 25 °С.

[451] После реакции конъюгат очищали и буфер заменили на буферную композицию с 10 мМ Трис, 80 мМ NaCl, 50 мкМ бисульфита, 3,5% сахарозы, 0,01% твина-20, pH 7,6 с

использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение ночи при 4 °C с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

[452] В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,7 молекул соединения **107** связанных на антитело (методом UV/Vis и SEC с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для соединения **107**, и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 201400 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ для антитела huMOV19), 95% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), и конечную концентрацию белка 1,1 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на ФИГ. 16.

Пример 33. Противоопухолевая активность отдельных доз конъюгата huML66-90 против NCI-H1703 НМКРЛ-ксенотрансплантатов у самок мышей с ТКИД

[453] Самки мышей CB,17 SCID, возрастом 6 недель, были получены от Charles River Laboratories. Мышей инокулировали 5×10^6 NCI-H1703 опухолевых клеток, суспендированных в 0,2 мл 50% Матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок. Когда объемы опухоли достигал примерно 100 мм^3 (16-й день после инокуляции), животные были рандомизированы в зависимости от объема опухоли на 4 группы по 6 мышей в каждой. Мыши получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,1 мл/мышь), или конъюгата **huML66-90** в дозах 5, 20 или 50 мкг/кг на основе концентрации соединения **90** на 1 день (17-й день после инокуляции).

[454] Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в мм^3 выражали, используя формулу $V = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times \frac{1}{2}$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

[455] Ингибирование роста опухоли (Т / С величина) определяли с помощью следующей формулы:

$$\text{T/C (\%)} = \frac{\text{Медианный объем опухоли обрабатываемых}}{\text{Медианный объем опухоли контроля}} \times 100.$$

Объем опухоли определяли одновременно для обработанных (Т) и контрольных (С) групп, когда объем опухоли контроля достиг заданного размера 1000 мм^3 . Суточный средний

объем опухоли каждой обработанной группы определяли в том числе у мышей без опухолей (0 мм³). В соответствии со стандартами NCI, $T / C \leq 42\%$ - минимальный уровень противоопухолевой активности. $T / C < 10\%$ считается высоким уровнем противоопухолевой активности.

[456] Как показано на ФИГ. 17, конъюгат **huML66-90** высокоактивен в дозах 20 мкг/кг и 50 мкг/кг, при этом 20 мкг/кг являются минимальной эффективной дозой (МЭД).

Пример 34. Фармакокинетика отдельных доз конъюгата huMov19-90 у самок мышей CD-1

[457] Самки мышей CD-1, возрастом 7 недель, были получены от Charles River Laboratories. Мыши получали однократное внутривенное введение конъюгата **huMov19-90** в форме одинарной внутривенной болюсной инъекции в боковую хвостовую вену. Каждая мышь получила дозу в 2,5 мг/кг из расчета на Ab. Доза и вводимый объем были индивидуализированы на основе массы тела каждой мыши. Инъекции проводили с помощью шприца объемом 1,0 мл, снабженным иглой 27 калибра, длиной ½ дюйма. В 2 часа и 30 минут, через 2, 4 и 8 часов, а также через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 и 28 дней после введения конъюгата **huMov19-90** мышей анестезировали путем ингаляции изофлураном и отбирали примерно 150 мкл крови из правого ретроорбитального кровяного синуса в гепаринизированную капиллярную трубку. В каждый момент времени (от 0 до 21 дней) кровь отбирали у всех трех мышей в одной группе. Группы сдавали кровь по очереди, так что у мышей в партии не брали образцы крови более чем два раза в течение 24-часового периода. В конечной точке времени, через 28 дней после введения, пробы брали у всех мышей. Образцы крови центрифугировали для отделения плазмы. 30 мкл плазмы переносили в отдельные помеченные микропробирки для каждого образца и момента времени, а затем хранили замороженными при -80 ° C, чтобы сделать возможным их последующий анализ методом ELISA для определения концентраций общего Ab (как неконъюгированного Ab, так и неповрежденного конъюгата) и неповрежденного конъюгата с использованием антитела против индолинобензодиазепина.

[458] Как показано на ФИГ. 18, конъюгат **huMov19-90** обладает клиренсом, аналогичным клиренсу антитела.

Пример 35. Катаболитное обогащение методом аффинного захвата со смолой протеина А

[459] Клетки KB, экспрессирующие фолатный рецептор фолата α (FR α), культивировали на 5 × T150 планшетах для тканевых культур. Насыщающее количество нацеленного на FR α конъюгата **huMov19-90** инкубировали с клетками KB в течение 24 часов при 37 °C в увлажненном инкубаторе, забуференном 5% CO₂. Через 24 часа среду, содержащую оттекающие от клеток катаболиты, собирали и объединяли для следующего анализа.

[460] Насыщающее количество антител против индолинобензодиазепаина связывали на суспензии смол протеина A путем инкубации в течение ночи при 4 °C. 1 мл предварительно связанного комплекса протеина A / антител против индолинобензодиазепаина инкубировали с 25 мл среды на опрокидном ротаторе в течение нескольких часов. Смолы мягко центрифугировали при 1000 об/мин, и супернатант сливали. Связанные с катаболитами смолы протеина A / антител против индолинобензодиазепаина промывали PBS. Катаболиты высвобождали в органическую фазу путем экстракции ацетоном. Катаболиты сушили под вакуумом в течение ночи, пока органический растворитель не испарился полностью. Катаболиты восстанавливали 20% ацетонитрила в воде, и анализировали с помощью ЖХ/МС.

Анализ МС

[461] Клеточные катаболиты идентифицировали с помощью СВЭЖХ/МС/МС с использованием масс-спектрометра высокого разрешения Q-Exactive (Thermo). Экстрагированные ионные хроматограммы (ЭИХ) были использованы для идентификации и характеристики катаболитов клетки-мишени. Все виды катаболитов, содержащих характерную массовую сигнатуру индолинобензодиазепаина (286 m/z), были идентифицированы (см. ФИГ. 19А и 19В).

Пример 36. Противоопухолевая активность отдельных доз конъюгата huMOV19-90 против NCI-H2110 НКРЛ-ксенотрансплантатов, Hec-1b эндометриальных ксенотрансплантатов и Ishikawa эндометриальных ксенотрансплантатов у самок мышей CB,17 SCID

[462] Самки мышей CB,17 SCID, возрастом 6 недель, были получены от Charles River Laboratories. Одну группу мышей инокулировали 1×10^7 NCI-H2110 опухолевых клеток, суспендированных в 0,1 мл 50% Матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок. Вторую группу мышей инокулировали 1×10^7 Hec-1b опухолевых клеток, суспендированных в 0,1 мл бессывороточной среды путем подкожной инъекции в правый бок. Третью группу мышей инокулировали 1×10^7 опухолевых клеток Ishikawa,

суспендированных в 0,1 мл 50% Матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок.

[463] Когда объемы опухоли достигал примерно 100 мм^3 (NCI-H2110 на 7-й день, Нес-1b на 7-й день, и Ishikawa на 17-й день после инокуляции), животные были рандомизированы в зависимости от объема опухоли на группы по 6 мышей в каждой.

[464] Мыши в эксперименте с ксенотрансплантатом NCI-H2110 получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь), или huMov19-90 в дозах 1, 3 или 5 мкг/кг на основе концентрации лекарства на 1 день (8-й день после инокуляции).

[465] Мыши в эксперименте с ксенотрансплантатом Нес-1b получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь), или huMov19-90 в дозах 10 или 30 мкг/кг или нетаргетного контрольного конъюгата chKTI-90 в дозе 30 мкг/кг на основе концентрации лекарства на 1 день (8-й день после инокуляции).

[466] Мыши в эксперименте с ксенотрансплантатом Ishikawa получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь), или huMov19-90 в дозах 10 или 30 мкг/кг или нетаргетного контрольного конъюгата chKTI-90 в дозе 30 мкг/кг на основе концентрации лекарства на 1 день (18-й день после инокуляции).

[467] Во всех экспериментах размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в мм^3 выражали, используя формулу $V = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times \frac{1}{2}$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

[468] Ингибирование роста опухоли (Т / С величина) определяли с помощью следующей формулы:

[469] $T/C (\%) = \text{Медианный объем опухоли обрабатываемых} / \text{Медианный объем опухоли контроля} \times 100$.

[470] Объем опухоли определяли одновременно для обработанных (Т) и контрольных (С) групп, когда объем опухоли контроля достиг заданного размера 1000 мм^3 . Суточный средний объем опухоли каждой обработанной группы определяли в том числе у мышей без опухолей (0 мм^3). В соответствии со стандартами NCI, $T / C \leq 42\%$ - минимальный уровень противоопухолевой активности. $T / C < 10\%$ считается высоким уровнем противоопухолевой активности.

[471] Как показано на ФИГ. 22, конъюгат huMov19-90 был неактивен в ксенотрансплантатной модели NCI-H2110 в дозе 1 мкг/кг, активен в дозе 3 мкг/кг с Т/С 13% и 1/6 PR и высокоактивен в дозе 5 мкг/кг с Т/С 2%, 6/6 PR и 4/6 CR.

[472] Как показано на ФИГ. 23, конъюгат huMov19-90 был активен в ксенотрансплантатной модели Нес-1b в дозе 10 мкг/кг с Т/С 15% и 1/6 PR и высокоактивен в дозе 30 мкг/кг с Т/С 9%, 6/6 PR и 6/6 CR. Нетаргетный контрольный конъюгат chKTI-90 был активен в дозе 30 мкг/кг с Т/С 34%.

[473] Как показано на ФИГ. 24, конъюгат huMov19-90 был активен в ксенотрансплантатной модели Ishikawa в дозе 10 мкг/кг с Т/С 27%, 6/6 PR и 6/6 CR и активен в дозе 30 мкг/кг с Т/С 15%, 6/6 PR и 6/6 CR. Нетаргетный контрольный конъюгат chKTI-90 был активен в дозе 30 мкг/кг с Т/С 24% и 4/6 PR.

Пример 37. Противоопухолевая активность отдельных доз huMOV19-107 против NCI-H2110 НМКРЛ-ксенотрансплантатов у самок мышей CB,17 SCID

[474] Анализ противоопухолевой активности *in vivo* huMOV19-107 у мышей с ТКИД осуществляли согласно протоколам, описанным в Примере 30 выше. Как показано на ФИГ. 25, конъюгат **huMov19-107** был высокоактивен в дозе 10 мкг/кг с 6/6 CR.

Пример 38. Аффинность конъюгата CD123-90

[475] Аффинность связывания ADC конъюгата примерного гуманизированного антитела против CD123 антитела, huCD123-6Gv4,7S3 антитела, анализировали и сравнивали с соответствующим неконъюгированным антителом с помощью проточной цитометрии с использованием клеток HNT-34. Клетки HNT-34 (5×10^4 клеток на образец), инкубировали с различными концентрациями ADC и неконъюгированного huCD123-6Gv4,7S3 антитела в 200 мкл буфера FACS (DMEM среды с добавлением 2% нормальной козьей сыворотки). Затем клетки осаждали, промывали дважды и инкубировали в течение 1 ч со 100 мкл фикоэритрин(ФЭ)-сконъюгированного козьего антитела против человеческого IgG (Jackson Laboratory). Клетки осаждали снова, промывали буфером FACS и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1% формальдегида. Образцы были получены с использованием проточного цитометра FACSCalibur с многолунковым пробоотборником HTS или проточного цитометра массивов FACS и проанализированы с помощью CellQuest Pro (все от BD Biosciences, San Diego, США). Для каждого образца

было рассчитано геометрическое среднее интенсивности флуоресценции для FL2 и отложено на графике в зависимости от концентрации антител в полулогарифмическом масштабе. Кривую доза-ответ генерировали нелинейной регрессией и значение EC50 каждой кривой, соответствующее явной константе диссоциации (Kd) каждого антитела, рассчитывали с использованием GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA).

[476] Как показано на ФИГ. 26, конъюгация влияла на аффинность примерного антитела против CD123 только умеренно.

Пример 39. Цитотоксическая активность *in vitro* huCD123-90

[477] Способность конъюгатов антитело-лекарственное средство (АЛК) huCD123-6, антитела против CD123, убивать клетки, которые экспрессируют CD123 на поверхности, измеряли с использованием анализов цитотоксичности *in vitro*. Клеточные линии культивировали в культуральной среде в соответствии с рекомендациями поставщика клеток (ATCC или DSMZ). Клетки, в количестве от 2000 до 10000 в 100 мкл культуральной среды, добавляли в каждую лунку плоскодонных 96-луночных планшетов. Чтобы блокировать Fc рецепторы на поверхности клетки, культуральную среду дополняли 100 нМ антитела chKTI (антитела того же изотипа). Конъюгаты разводили в культуральной среде с использованием 3-кратных серийных разведений и добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Дабы определить вклад CD123-независимой цитотоксичности, в некоторые лунки перед конъюгатами добавляли CD123 блок (*напр.*, 100 нМ антитела chCD123-6). Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых конъюгатов, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Эксперименты были проведены в трех повторах для каждой точки данных. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажненном 6% CO₂ инкубаторе в течение 4-7 дней. Затем определяли относительное количество жизнеспособных клеток в каждой лунке с помощью Cell Counting Kit-8 на основе WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD). Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения, и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками). Фракцию выживших клеток наносили на график в зависимости от концентрации конъюгата в полулогарифмическом масштабе.

[478] В исследовании использовали 15 CD123-положительных клеточных линий различного происхождения (ОМЛ, В-ОЛЛ, ХМЛ и НХЛ) (Таблица 4). Большинство

клеточных линий были получены от пациентов-носителей злокачественности с по крайней мере одним отрицательным прогностическим фактором (например, повышенная экспрессия Р-гликопротеина, повышенная экспрессия EVI1, изменения p53, мутации DNMT3A, внутренняя tandemная дупликация FLT3). Конъюгаты продемонстрировали высокую активность на этих клеточных линиях со значениями IC₅₀ от суб-пМ до низких нМ (Таблица 4).

Таблица 4. *In vitro* цитотоксичность конъюгата **huCD123-6-90** против CD123-положительных клеточных линий различного происхождения

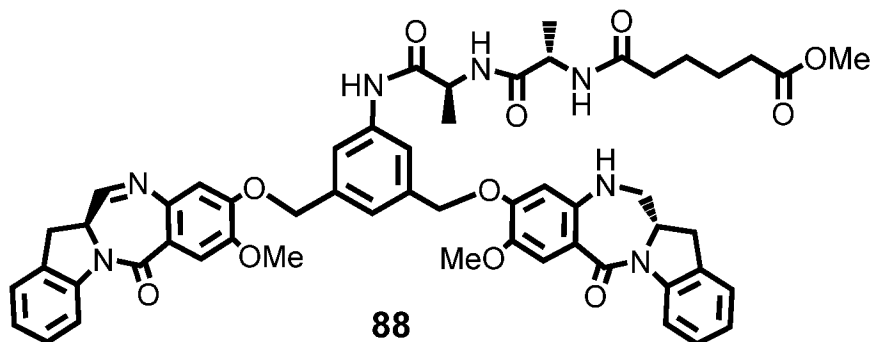
Клеточная линия	Происхождение	Отрицательный прогностический фактор	IC ₅₀ (М)
THP1	ОМЛ	делеция p53	6,7E-12
SHI-1	ОМЛ	изменения в гене p53	1,3E-11
KO52	ОМЛ	мутантный p53, сверхэкспрессия Pgp	1,4E-11
KASUMI-3	ОМЛ	сверхэкспрессия EVI1 и Pgp	9,8E-12
KG-1	ОМЛ	мутантный p53, сверхэкспрессия Pgp	2,2E-10
OCI-AML2	ОМЛ	мутация DNMT3A	8,8E-11
HNT-34	ОМЛ	сверхэкспрессия MECOM (EVI1)	2,0E-12
MV4-11	ОМЛ	внутренняя tandemная дупликация FLT3	5,6E-13
MOLM-13	ОМЛ	внутренняя tandemная дупликация FLT3	4,9E-13
EOL-1	ОМЛ		2,5E-12
MOLM-1	ХМЛ	сверхэкспрессия EVI1 и Pgp	2,9E-11
KOPN8	В-ОЛЛ		1,1E-11
JM-1	В-ОЛЛ		2,4E-11
KCL-22	ХМЛ		3,0E-11
Granta519	НХЛ		1,2E-12

[479] Все публикации, патенты, патентные заявки, интернет-сайты, и учетные номера/последовательности в базах данных (в том числе полинуклеотидные и полипептидные последовательности), цитируемые здесь, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей, в той же степени, как если бы для

каждой отдельной публикации, патента, патентной заявки, интернет-сайта или учетного номера/последовательности в базе данных было конкретно и отдельно указано, что она таким образом включена посредством ссылки.

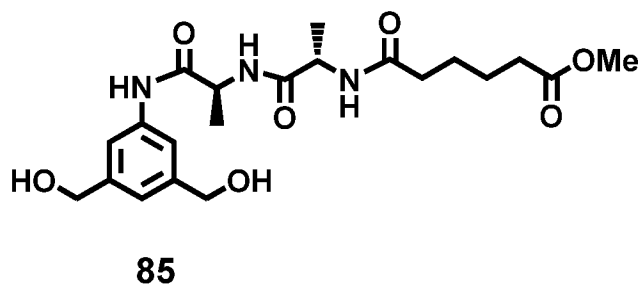
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения **88**, представленного следующей структурной формулой:

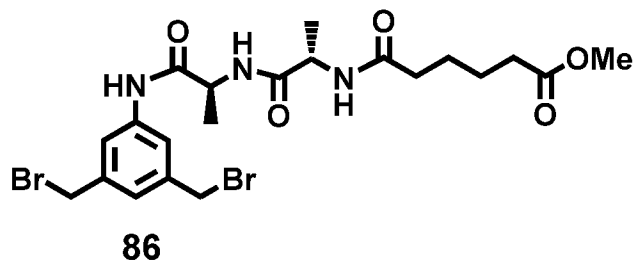


или его соли, причем способ предусматривает:

(a) осуществление взаимодействия соединения **85**, представленного следующей структурной формулой:

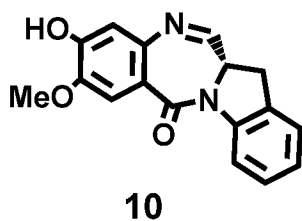


или его соли с реагентом бромирования с образованием соединения, представленного следующей структурной формулой:

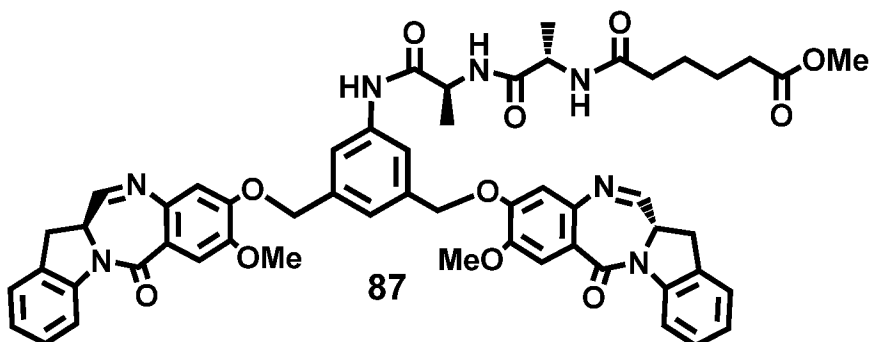


или его соли;

(b) связывание соединения **86** или его соли с соединением **10**, представленным следующей структурной формулой:



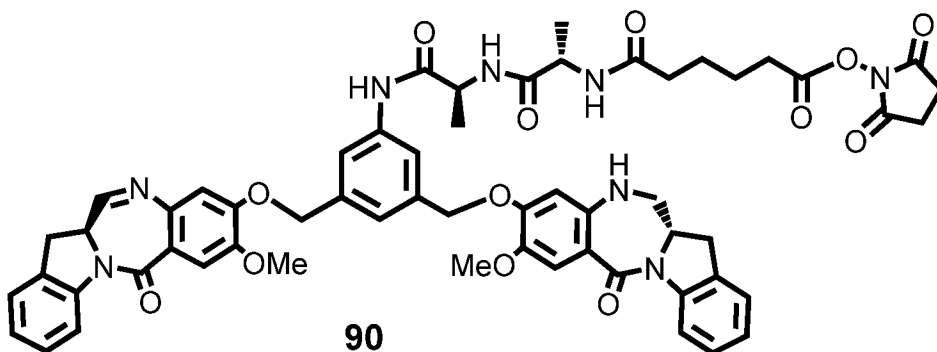
с образованием соединения **87**, представленного следующей структурной формулой:



или его соли; и

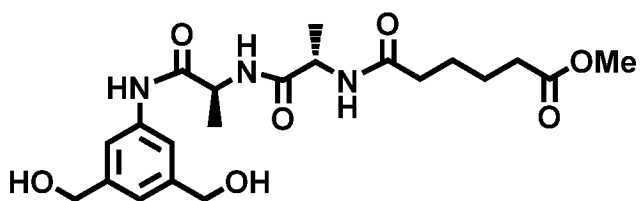
(с) восстановление соединения **87** или его соли с образованием соединения **88** или его соли.

2. Способ получения соединения **90**, представленного следующей структурной формулой:

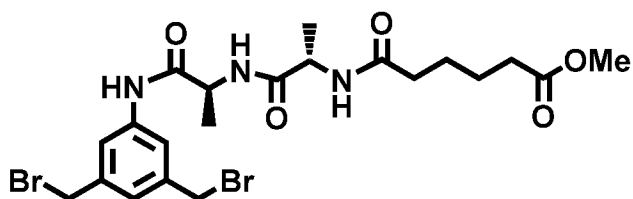


или его соли, причем способ предусматривает:

(а) осуществление взаимодействия соединения **85**, представленного следующей структурной формулой:

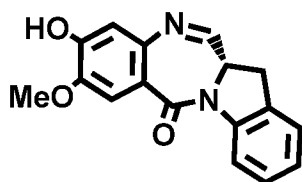
**85**

или его соли с реагентом бромирования с образованием соединения **86**, представленного следующей структурной формулой:

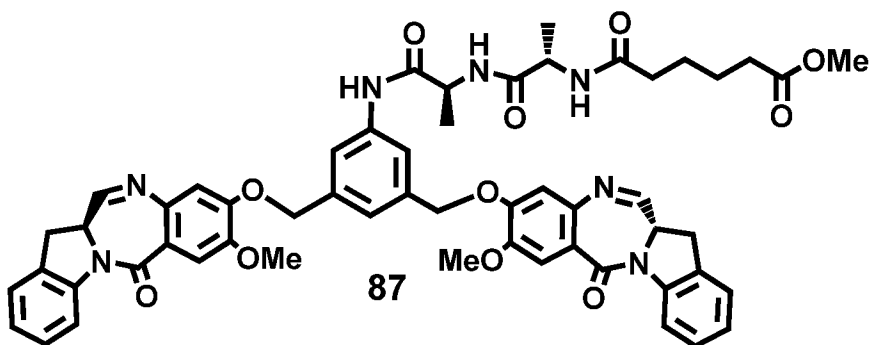
**86**

или его соли;

(b) связывание соединения **86** или его соли с соединением **10**, представленным следующей структурной формулой:

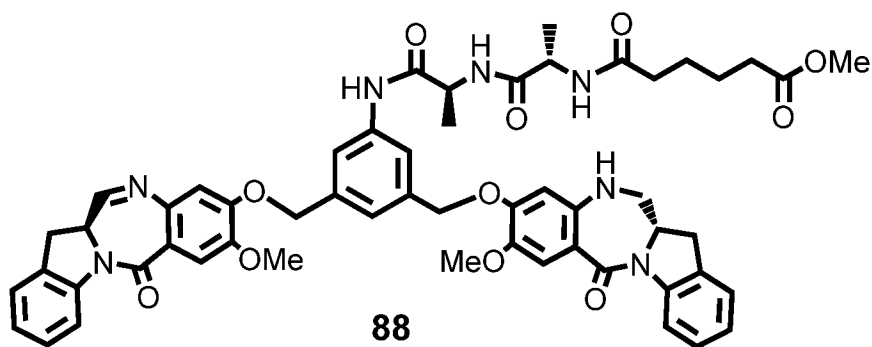
**10**

с образованием соединения **87**, представленного следующей структурной формулой:

**87**

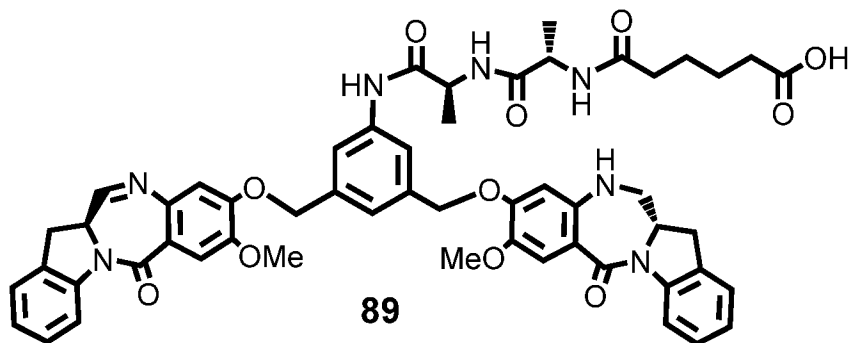
или его соли; и

(c) восстановление соединения **87** или его соли с образованием соединения **88**, представленного следующей структурной формулой:



или его соли;

(d) деэтерификации соединения **88** или его соли с образованием соединения, представленного следующей структурной формулой:



или его соли; и

(e) активирование соединения **89** или его соли с образованием соединения **90** или его соли.

3. Способ по пп. 1 или 2, при котором стадия (а) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **85** или его соли с карбонтетрабромидом.

4. Способ по п. 3, при котором стадия (а) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **85** или его соли с карбонтетрабромидом в присутствии трифенилфосфина.

5. Способ по п. 4, при котором реакцию взаимодействия стадии (а) проводили в диметилформамиде (ДМФА).

6. Способ по любому из пп. 1-5, при котором стадия (b) включает в себя

осуществление взаимодействия соединения **86** или его соли с соединением **10** в присутствии K_2CO_3 .

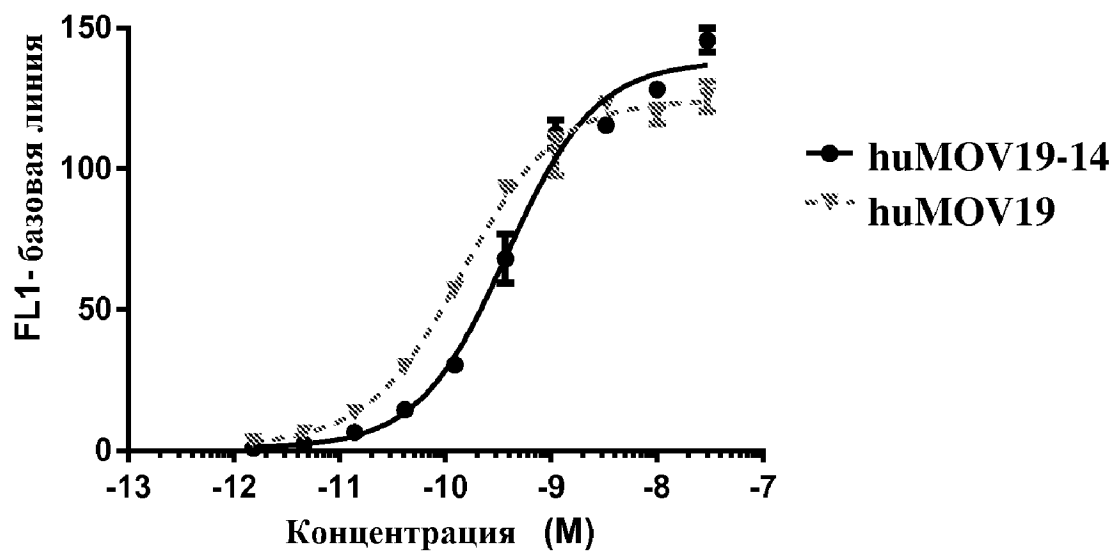
7. Способ по любому из пп. 1-6, при котором стадия (с) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **87** или его соли с восстановителем, которым является триацетоксиборгидрид натрия (НТАБ).

8. Способ по любому из пп. 2-7, при котором стадия (d) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **88** или его соли с триметилстаннанолом (Me_3SnOH).

9. Способ по любому из пп. 2-8, при котором стадия (e) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **89** или его соли с N-гидроксисукцинамидом (NHS).

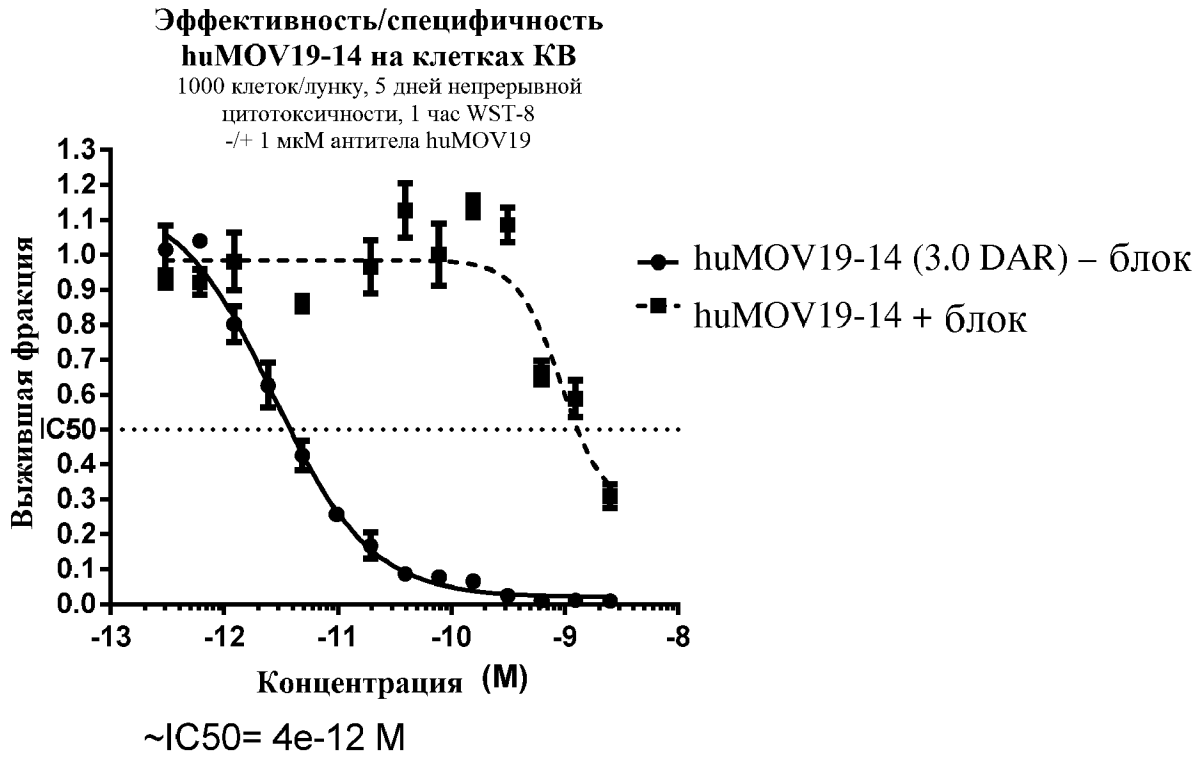
10. Способ по п. 9, при котором стадия (e) включает в себя осуществление взаимодействия соединения **89** или его соли с N-гидроксисукцинамидом в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК).

Аффинность связывания huMOV19-14 с
клетками T47D по сравнению с антителом
huMOV19

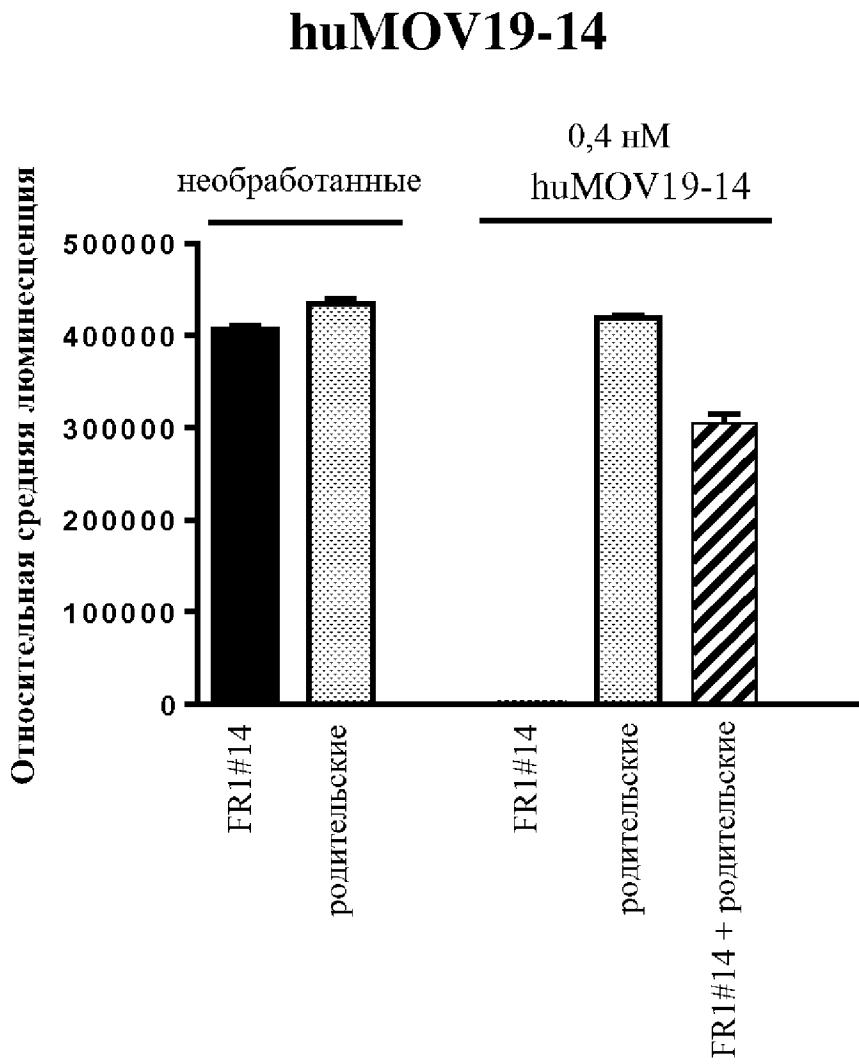


	huMOV19-14	huMOV19
EC50	3,793e-010	1,438e-010

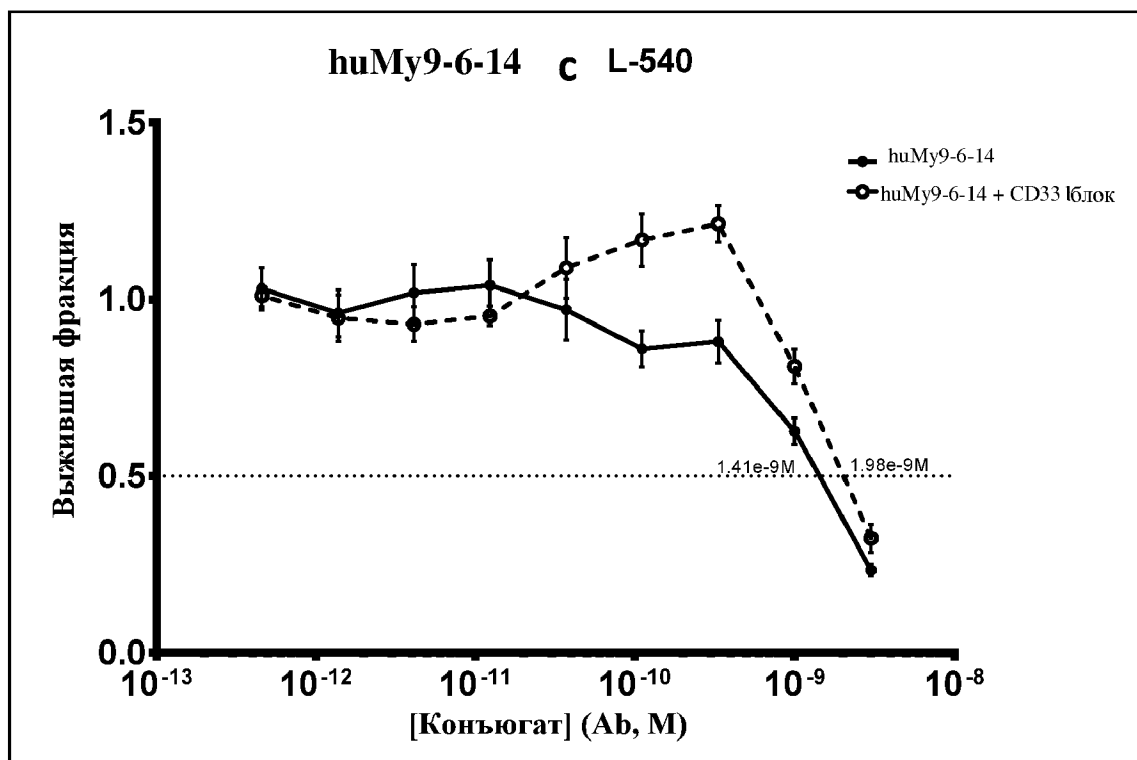
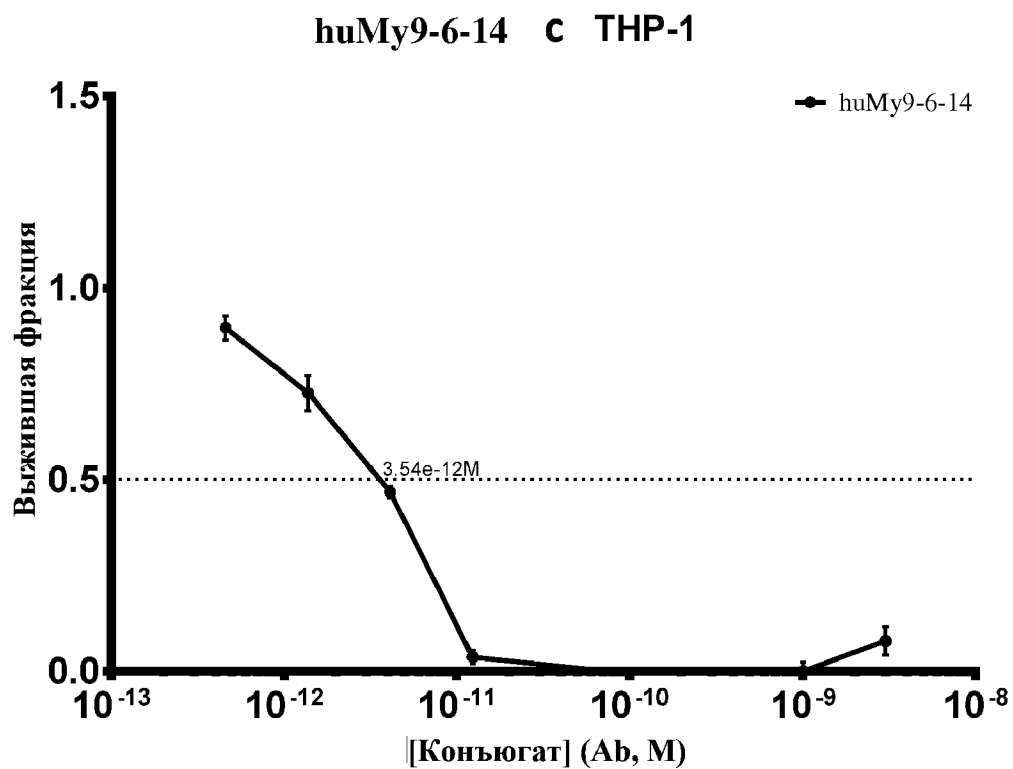
ФИГ. 1



ФИГ. 2

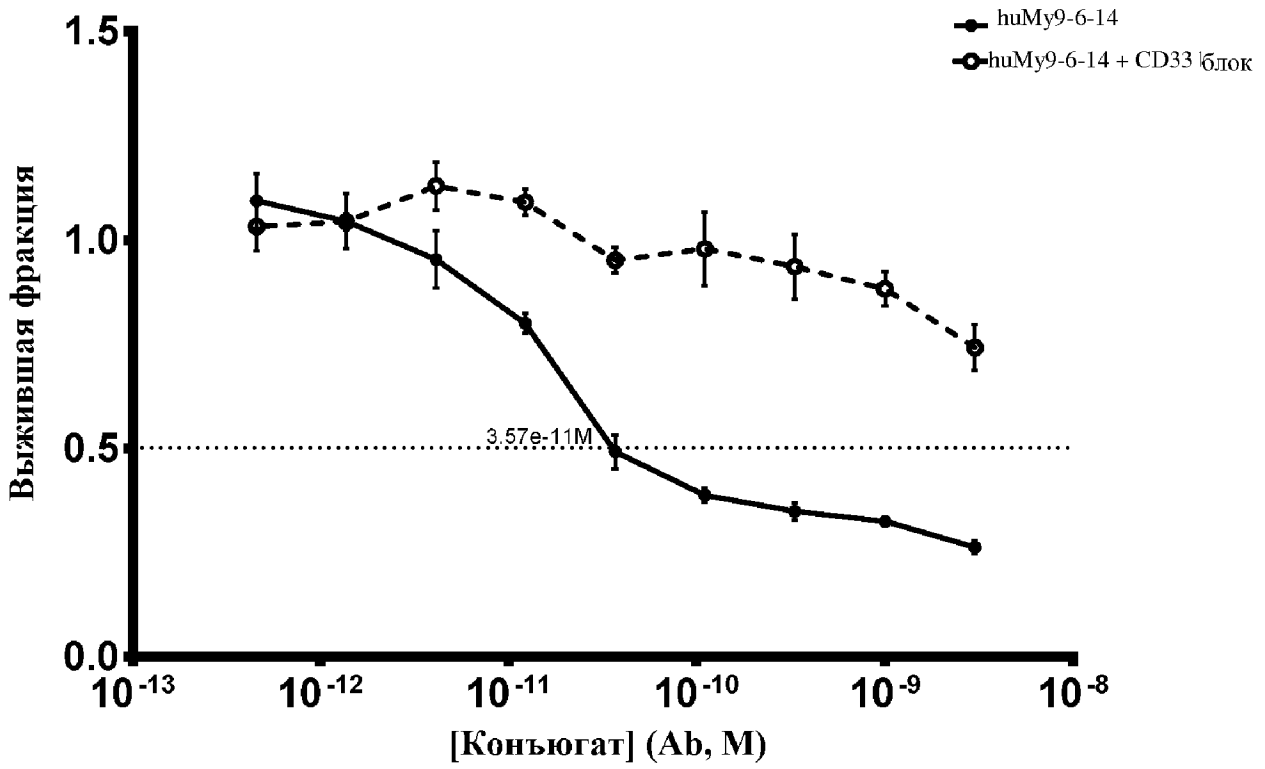


ФИГ. 3

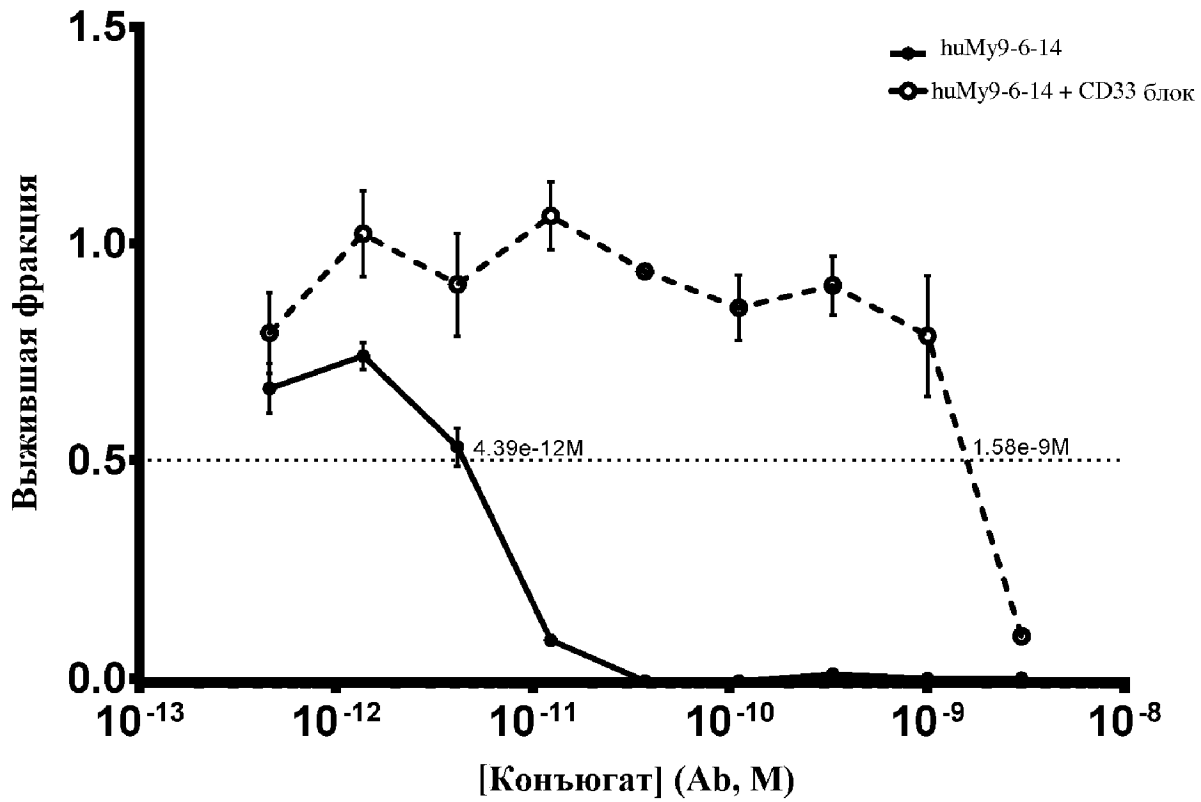


ФИГ. 4А

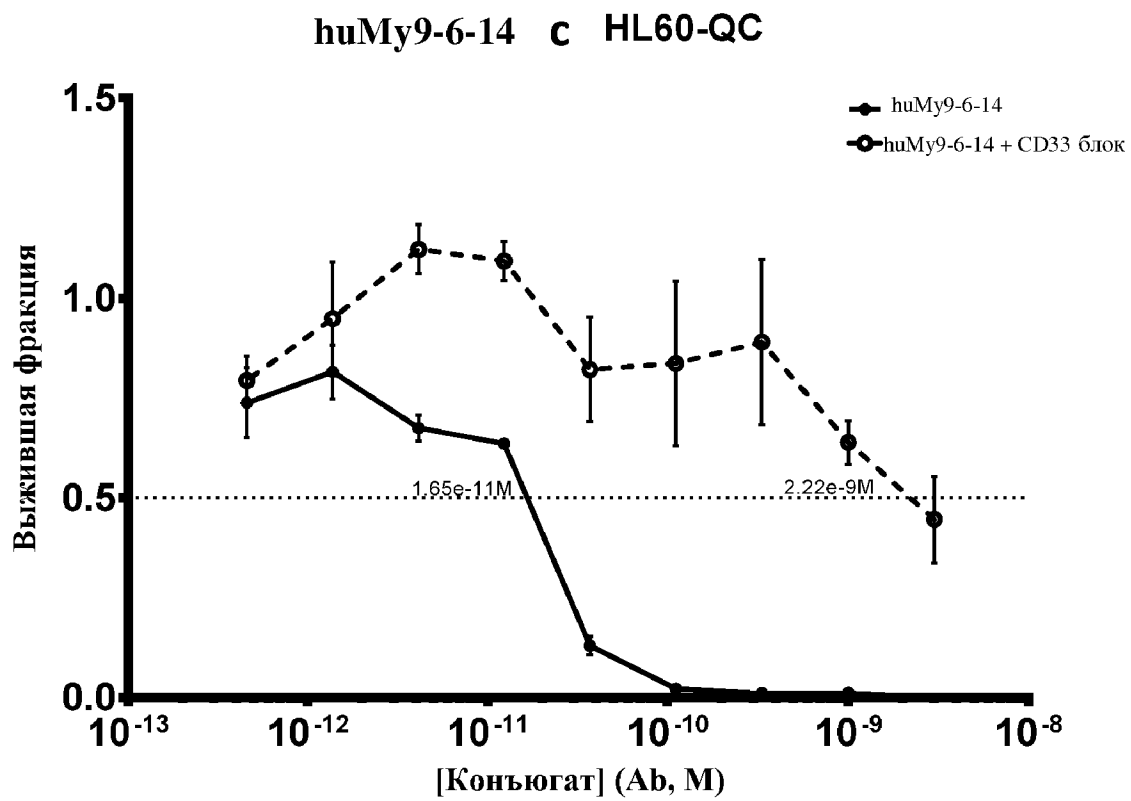
huMy9-6-14 с HNT-34



huMy9-6-14 с EOL-1

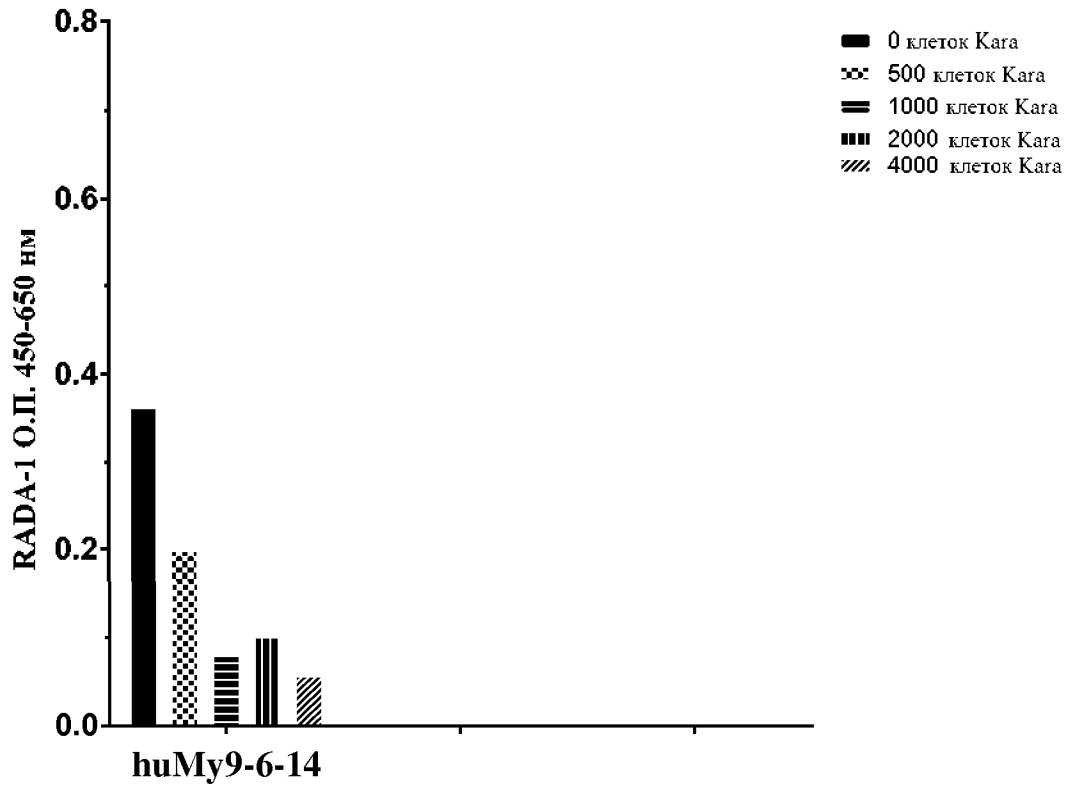


ФИГ. 4В

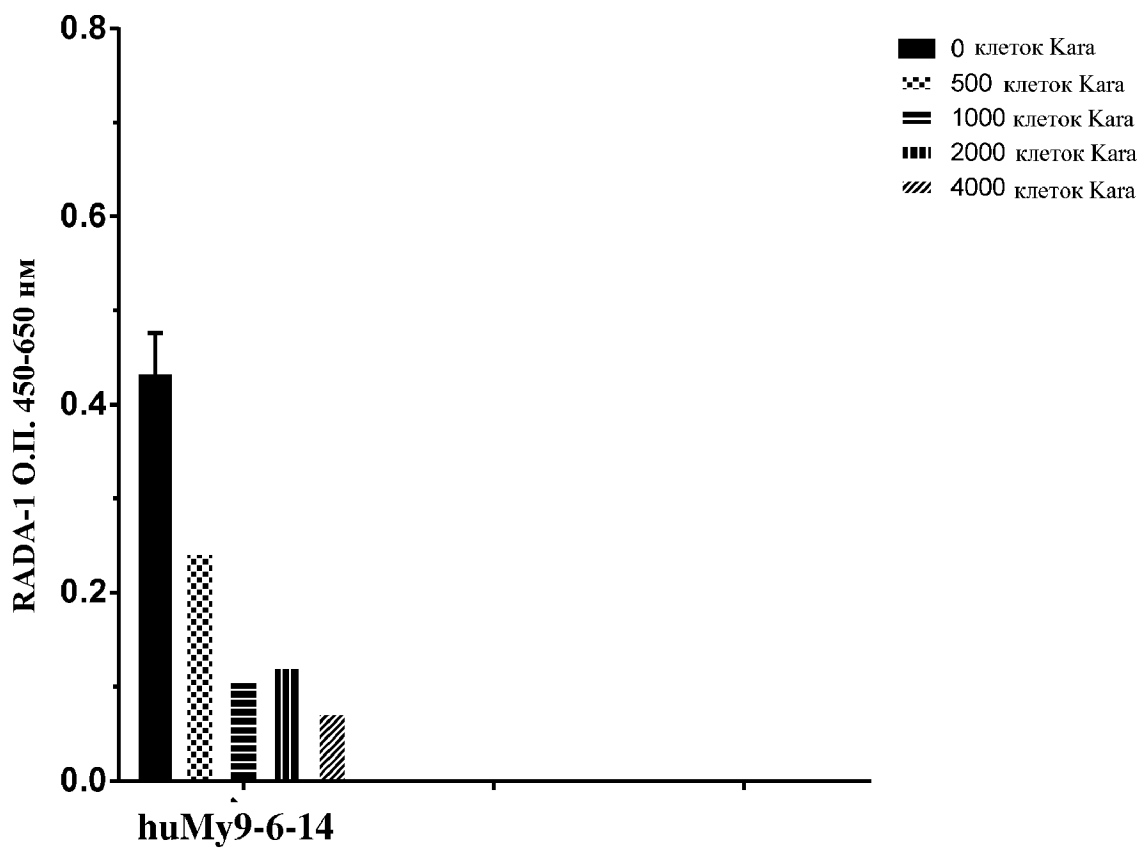
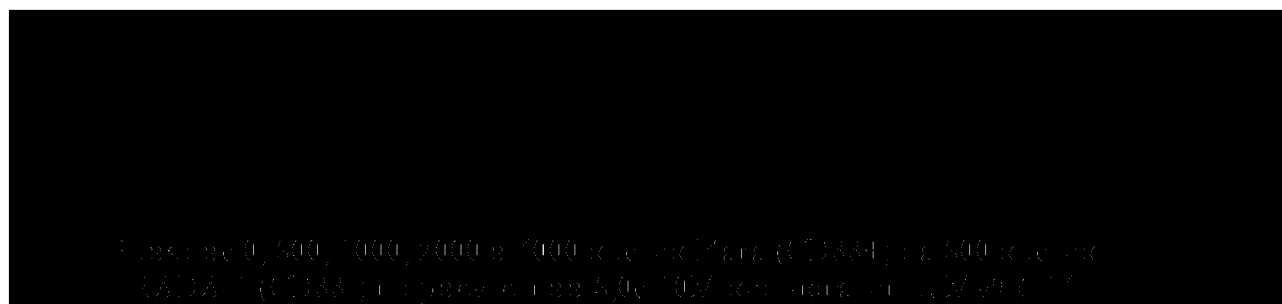


ФИГ. 4С

Влияние 0, 500, 1000, 2000 и 4000 клеток Kapa (CD33+) на 500 клеток RADA-1 (CD33-) в присутствии $1,0 \times 10^{-9}$ M конъюгата huMy9-6-14

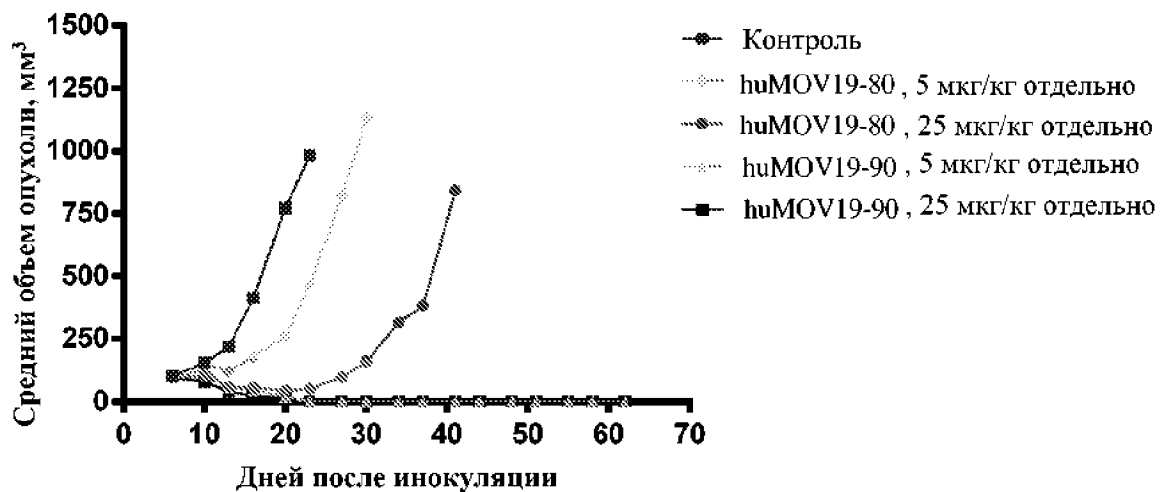


ФИГ. 5А



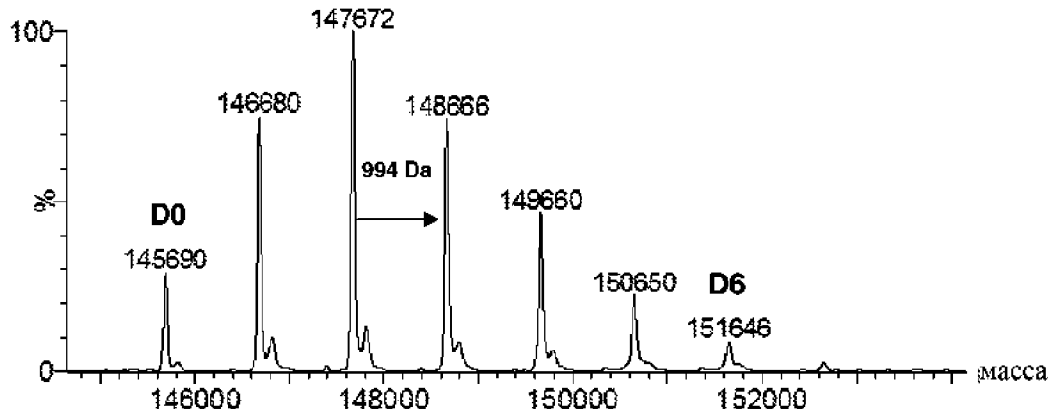
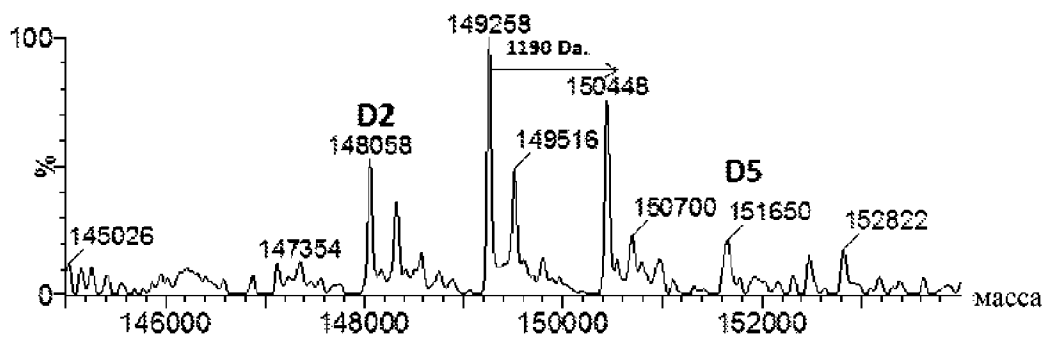
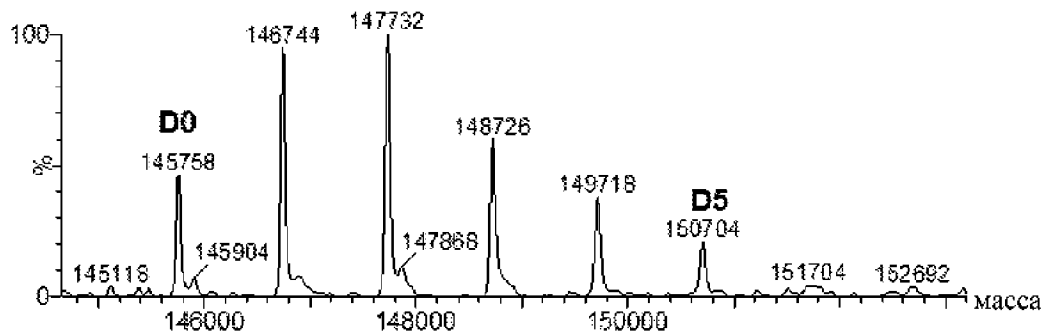
ФИГ. 5В

Противоопухолевая активность (средний объем опухоли, мм³) huMOV19-80 и huMOV19-90 у мышей SCID, несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110

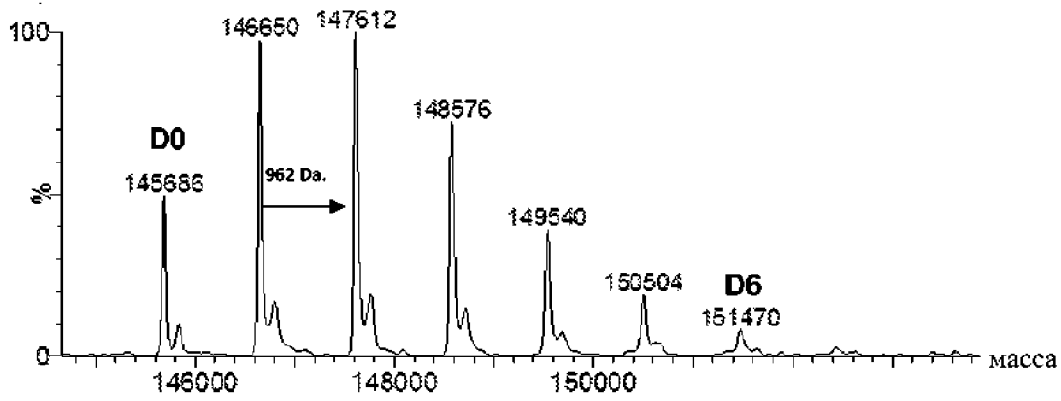
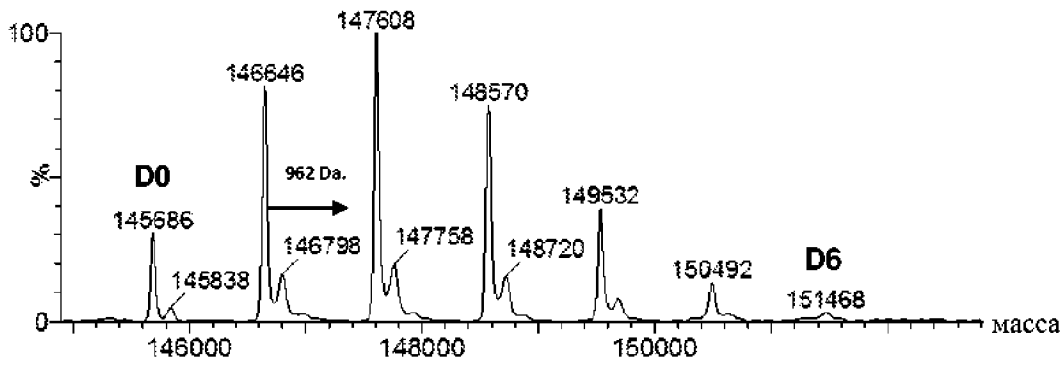
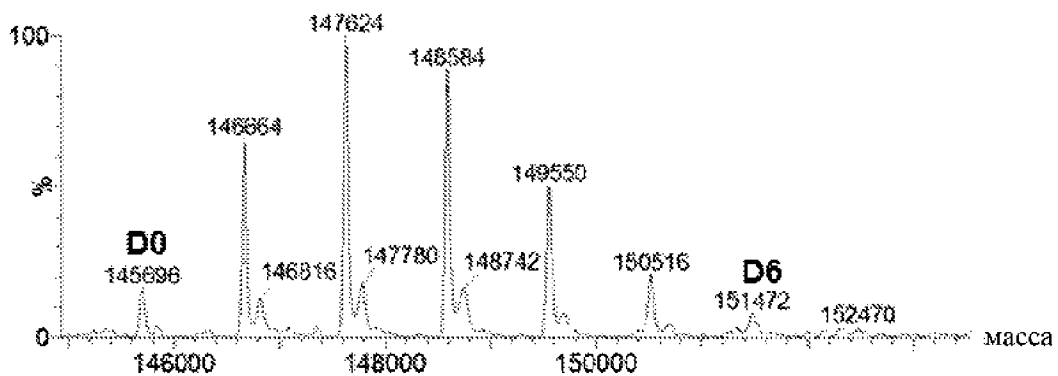


Группа лечения		Доза (мкг/кг)	T/C (День 23)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Контроль	-	-	-	-	-
B	huMOV19-80	5	47%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMOV19-80	25	5%	5/6	1/6	Высокоактивен
D	huMOV19-90	5	0%	6/6	6/6	Высокоактивен
E	huMOV19-90	25	0%	6/6	6/6	Высокоактивен

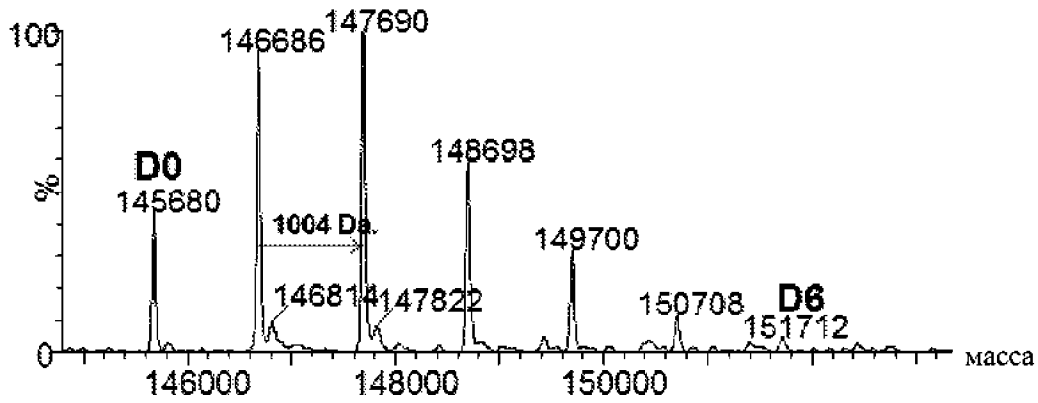
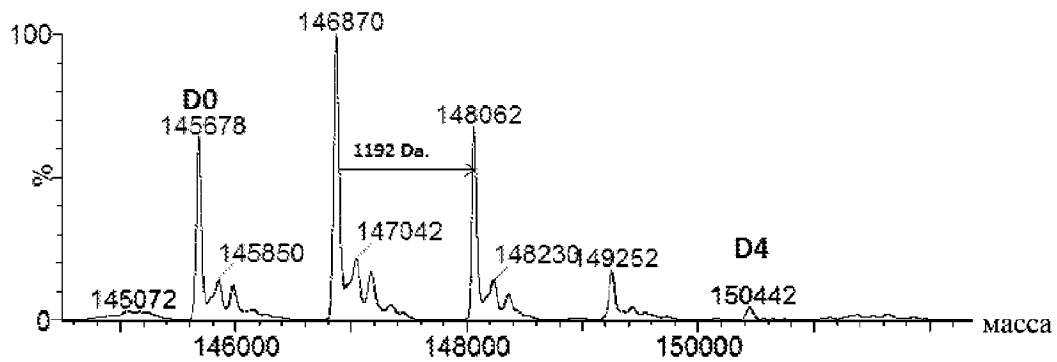
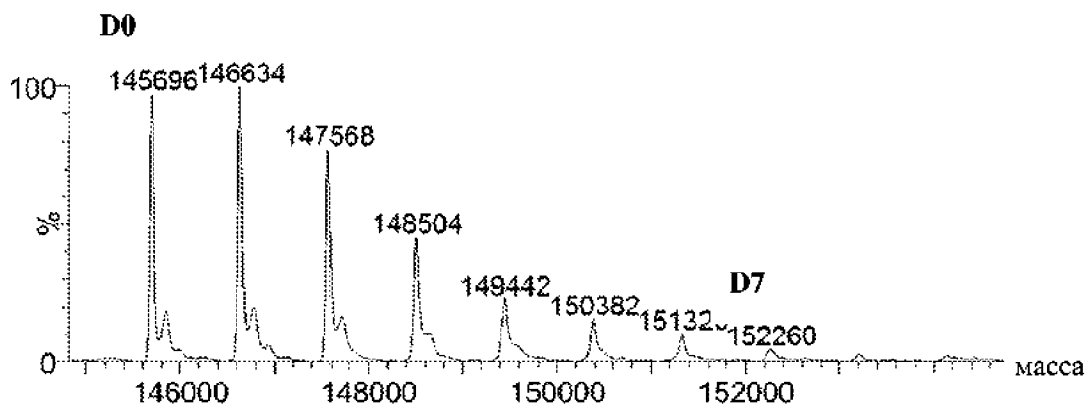
ФИГ. 6

МС дегликозилированного конъюгата huMov19-14**МС дегликозилированного конъюгата huMov19-сульфо-SPDB-98****МС дегликозилированного конъюгата huMov19-35**

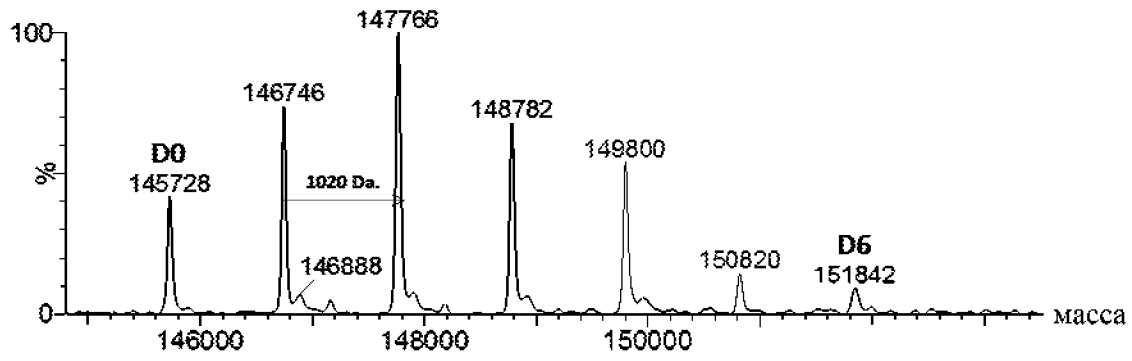
ФИГ. 7А

МС дегликозилированного конъюгата huMov19-63**МС дегликозилированного конъюгата huMov19-80****МС дегликозилированного конъюгата huMov19-90**

ФИГ. 7В

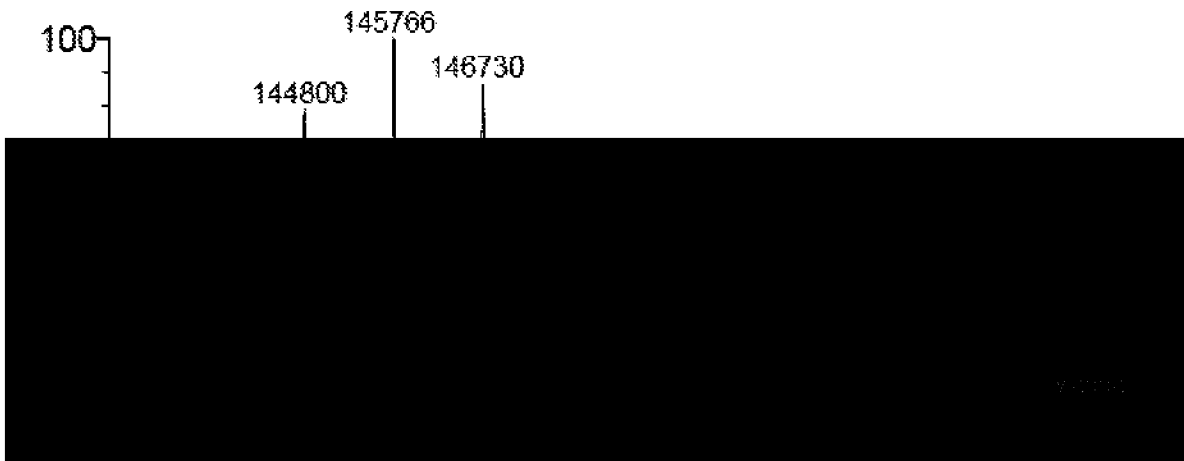
МС дегликозилированного конъюгата huMov19-49**МС дегликозилированного конъюгата huMov19-сульфо-SPDB-99****МС дегликозилированного конъюгата huMov19-70**

ФИГ. 7С

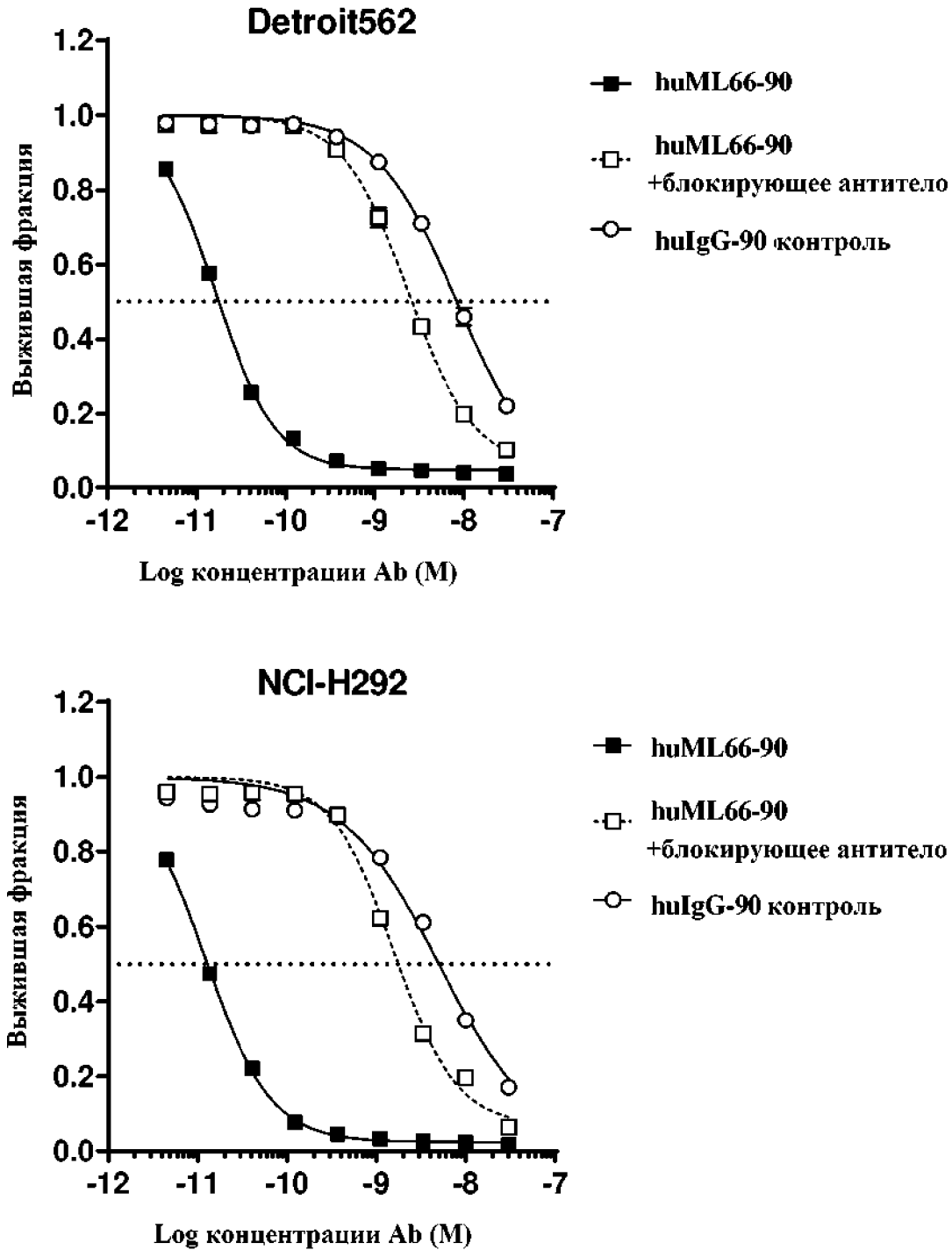
МС дегликозилированного конъюгата huMov19-23

ФИГ. 7D

МС дегликозилированного конъюгата huML66-90



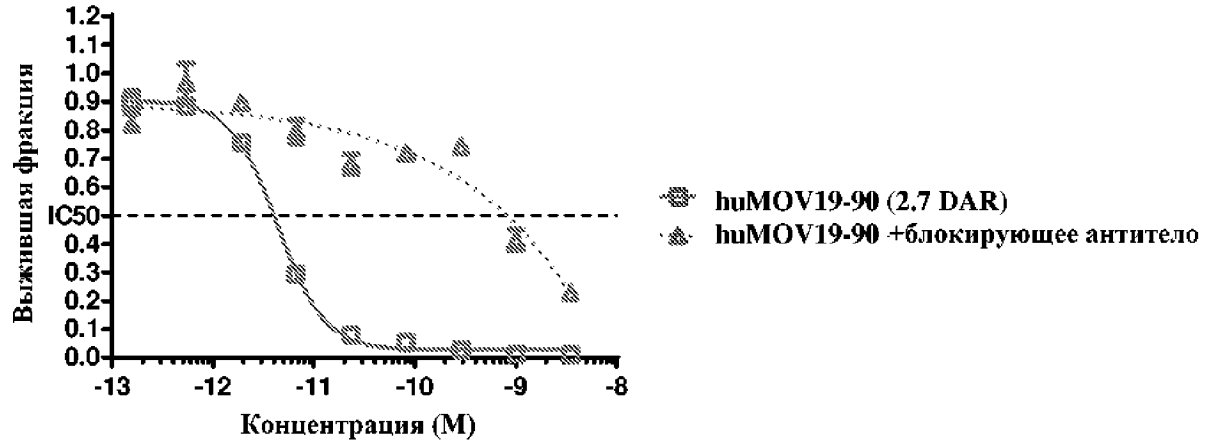
ФИГ. 8



ФИГ. 9

Эффективность конъюгата huMOV19-90 на клетках KB

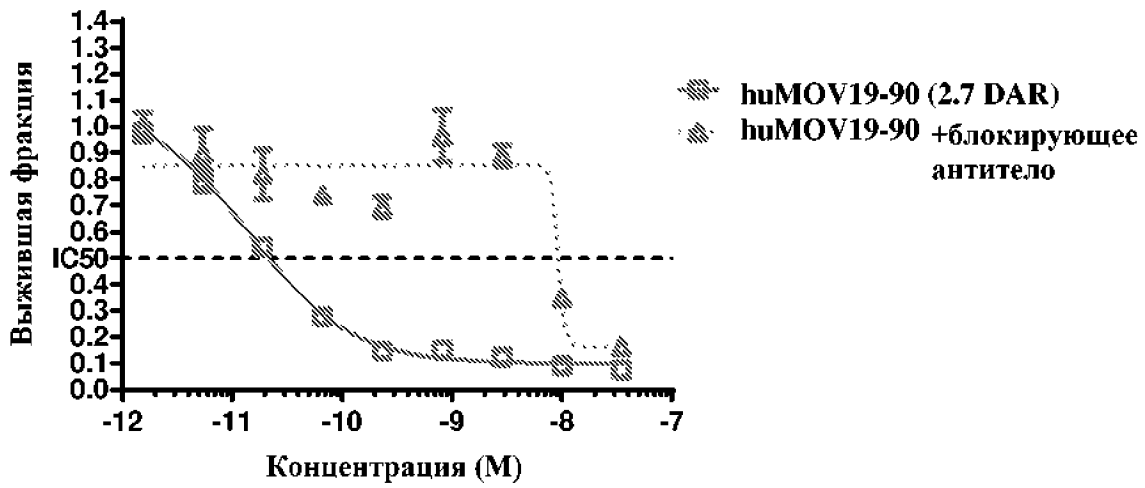
-/+ 1 мкМ блокирующего антитела huMOV19
1000 клеток/лунку, 5 дней непрерывно, 2 часа WST-8



ФИГ. 10

Эффективность huMOV19-90 на клетках NCI-H2110

-/+ 1 мкМ блокирующего антитела huMOV19
2000 клеток/лунку, 5 дней непрерывно, 3 часа WST-8

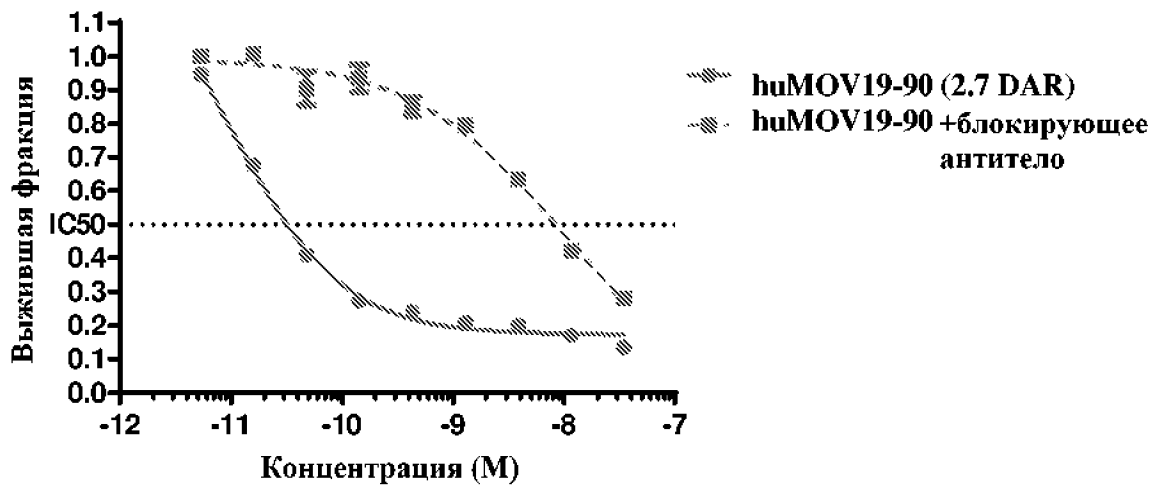


ФИГ. 11

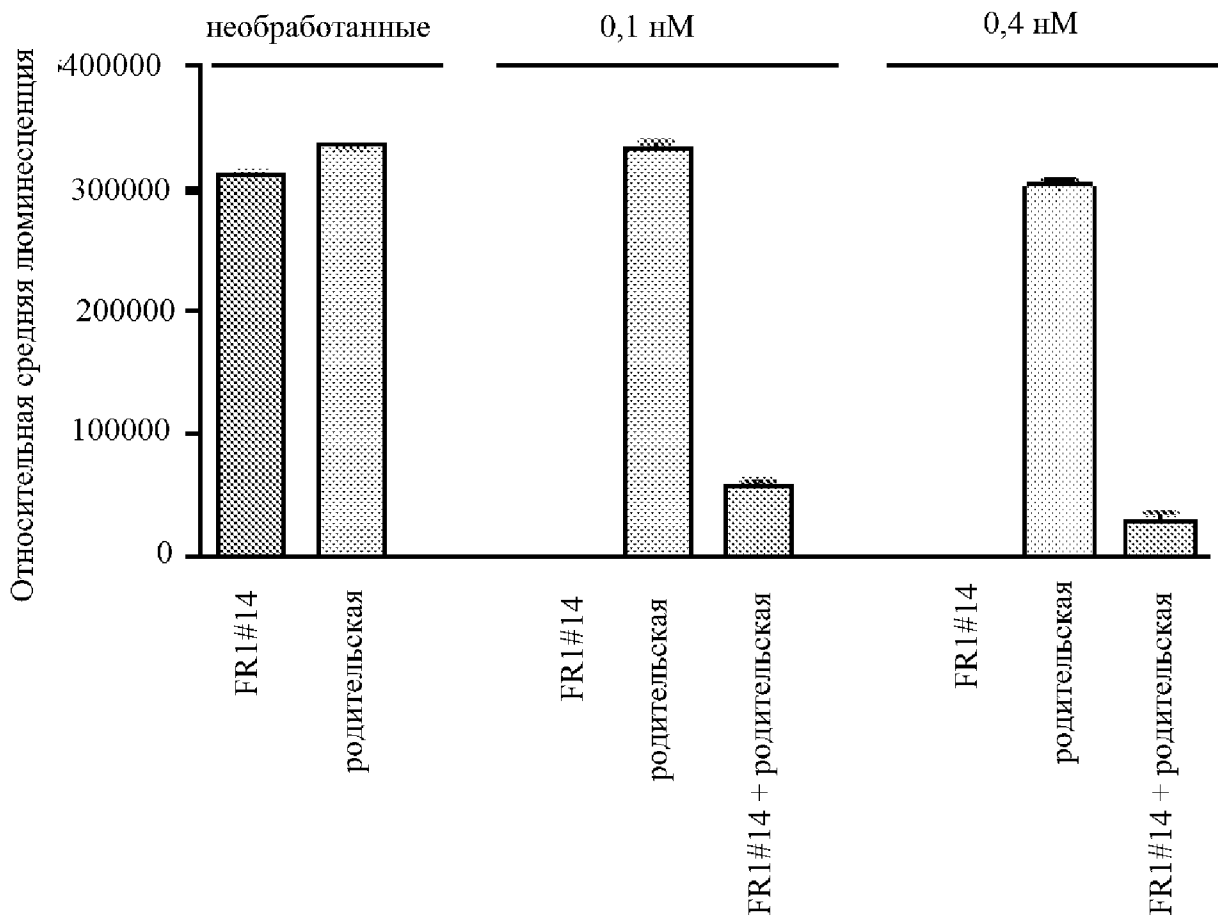
Эффективность huMOV19-90 на клетках T47D

-/+ 1 мкМ блокирующего антитела huMOV19

2000 клеток/лунку, 6 дней непрерывной инкубации, Alamar Blue O/N

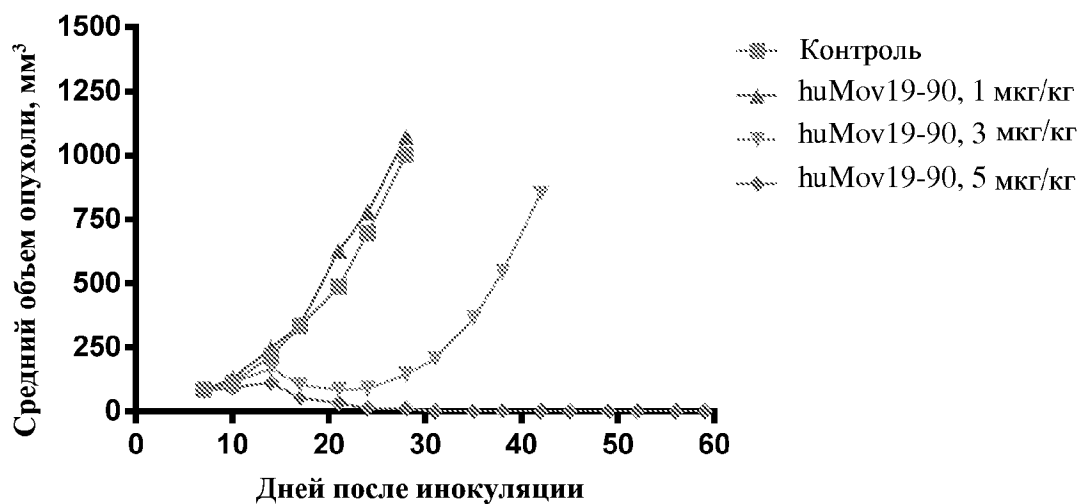


ФИГ. 12

huMOV19-90

ФИГ. 13

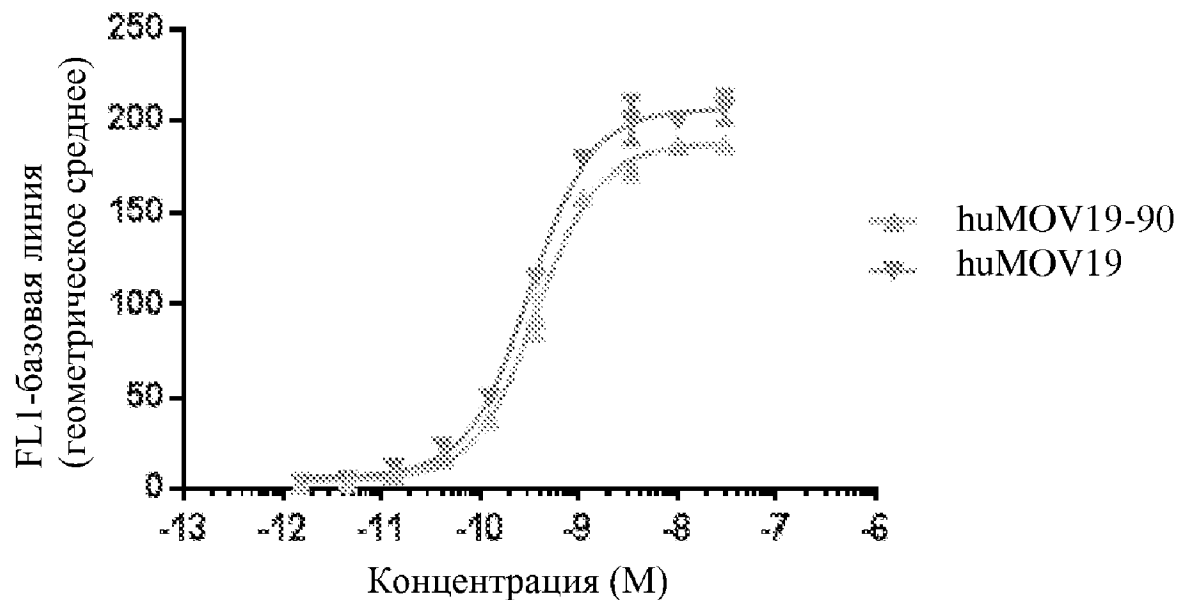
Противоопухолевая активность (средний объем опухоли, мм³) huMov 19-90 у мышей SCID, несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110



Группа лечения		Доза соединения (мкг/кг)	T/C (День 28)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Контроль	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	1	107%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMov19-90	3	14%	1/6	0/6	Активен
D	huMov19-90	5	1%	6/6	3/6	Высокоактивен

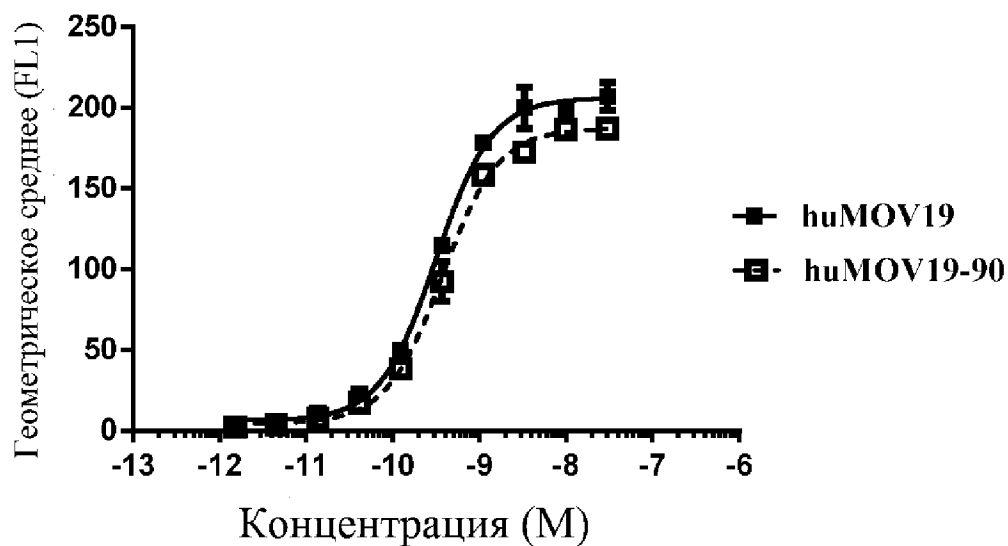
ФИГ. 14

Связывание конъюгата huMOV-19-90 на клетках T47D

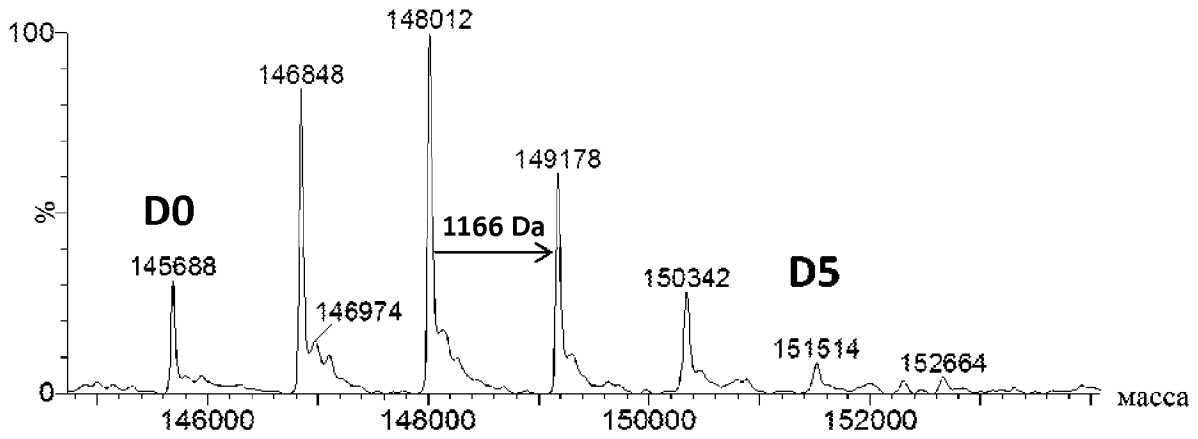


	huMOV19-90	huMOV19
EC50	$3,708e-010$	$3,136e-010$

ФИГ. 15А

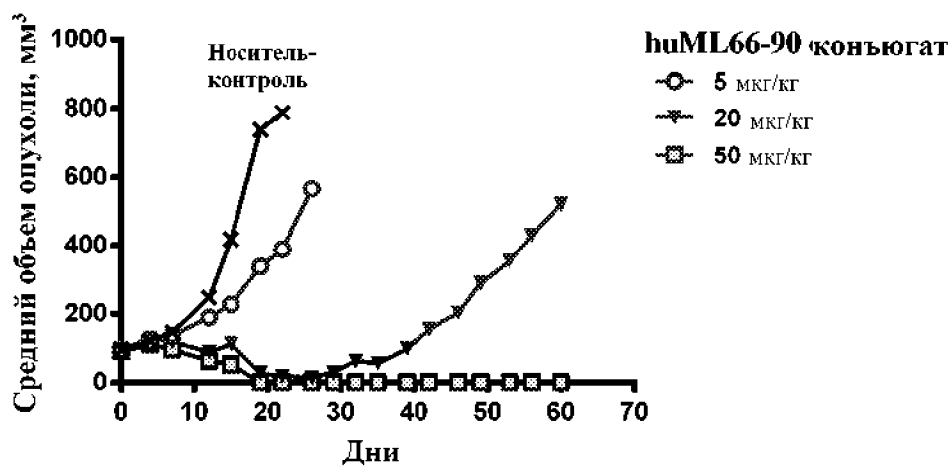


ФИГ. 15В

МС дегликозилированного конъюгата huMov19-сульфо-SPDB-107

ФИГ. 16

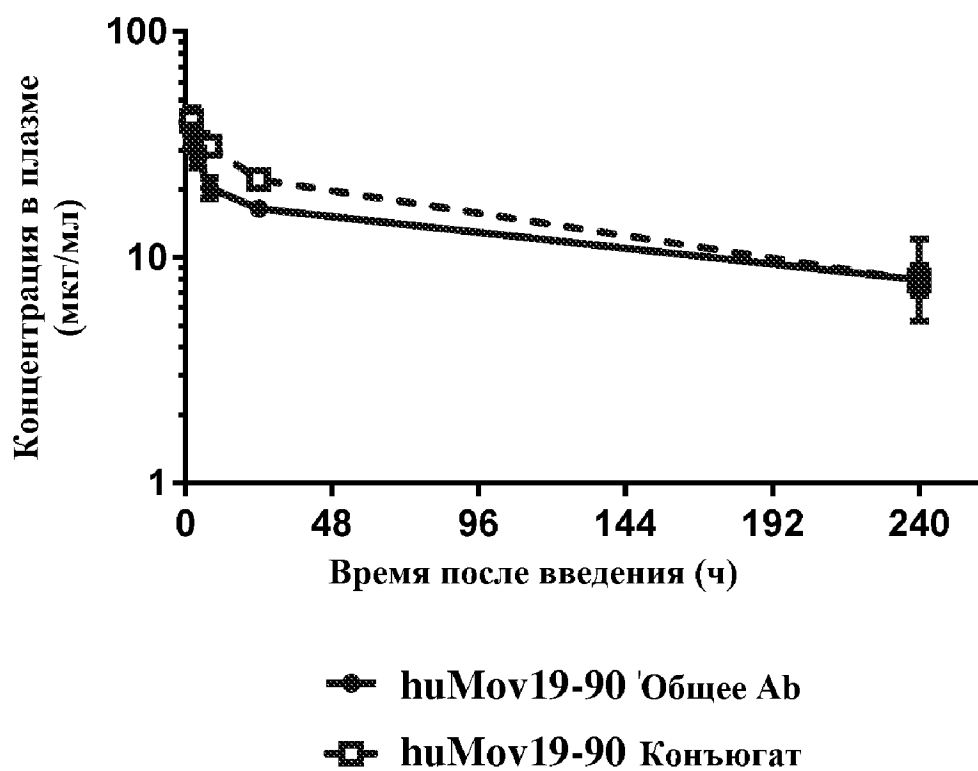
Противоопухолевая активность (средний объем опухоли, мм³) конъюгата huML66-90 у мышей SCID, несущих ксенотрансплантаты NCI-H1703



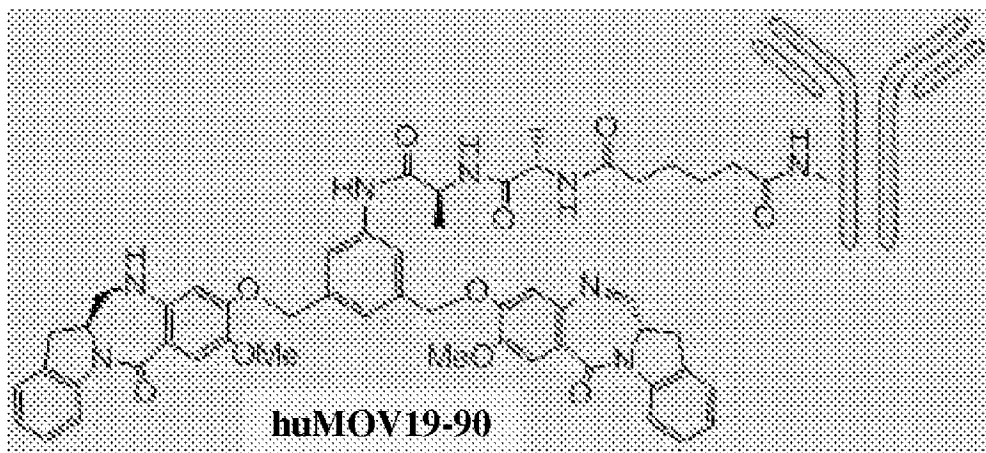
Агент	Доза Соед. 90 (мкг/кг)	Доза Аб (мг/кг)	Т/С (%)	CR	Результат
huML66-90 конъюгат	5	0,3	46	0/6	Неактивен
	20	1,1	4	3/6	Высокоактивен
	50	2,8	0	6/6	Высокоактивен

ФИГ. 17

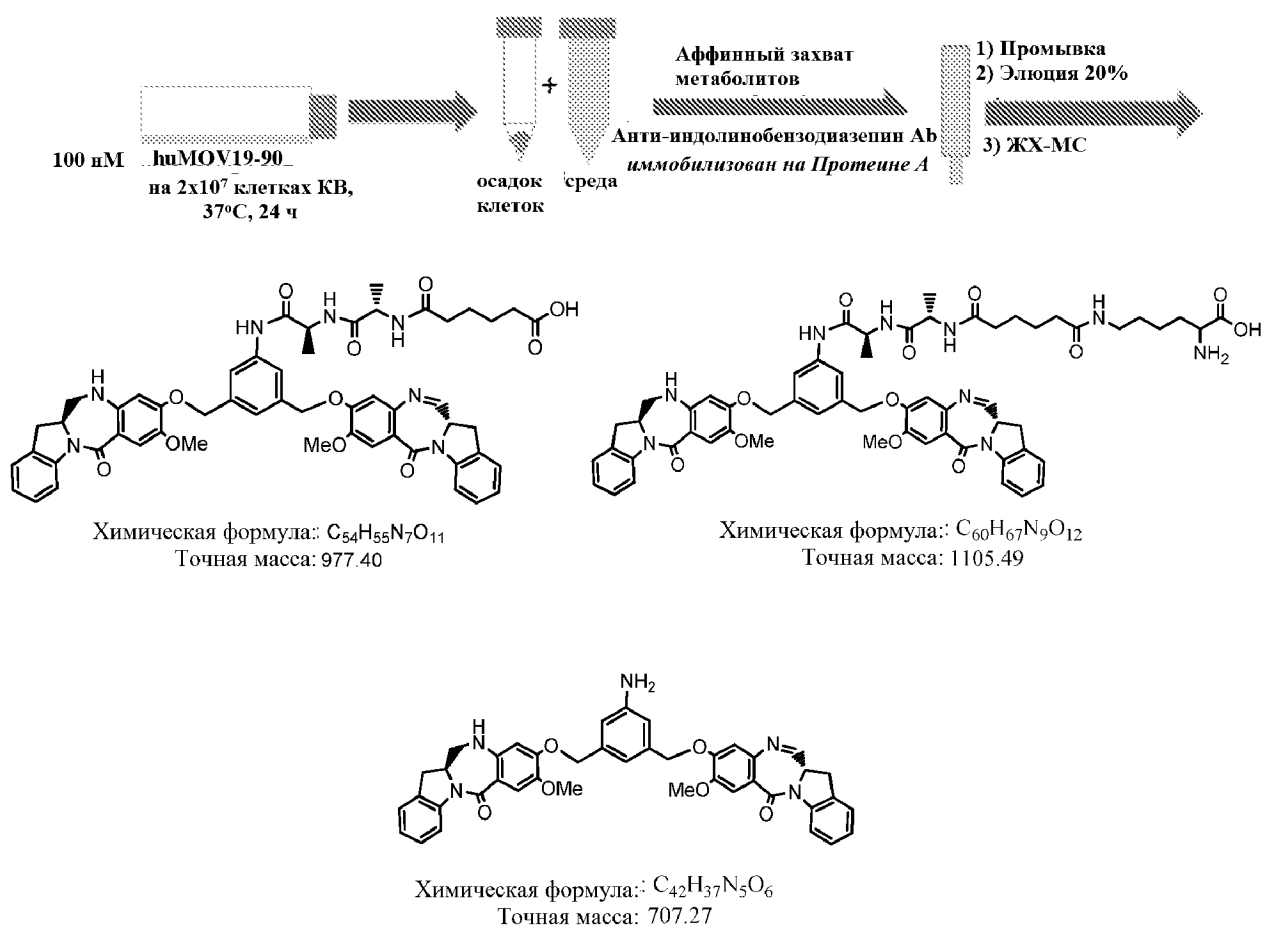
Фармакокинетика huMov19-90 в мышах CD-1



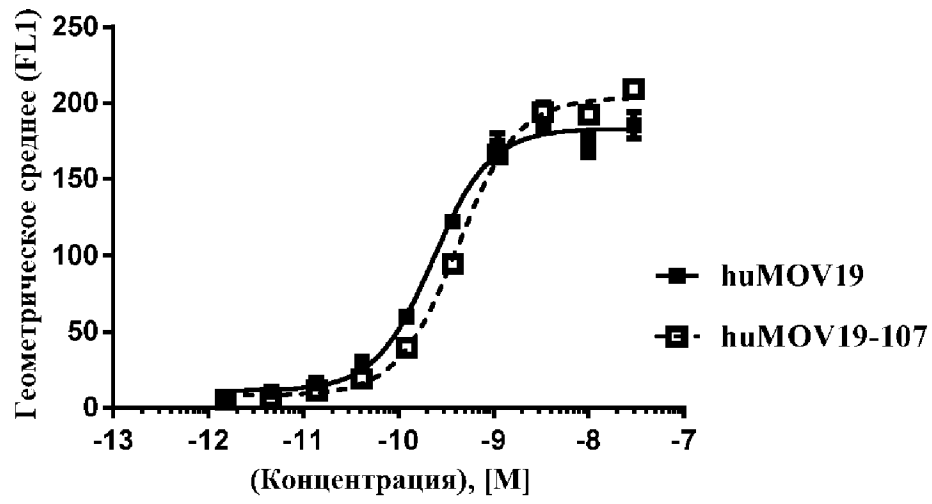
ФИГ. 18



ФИГ. 19А

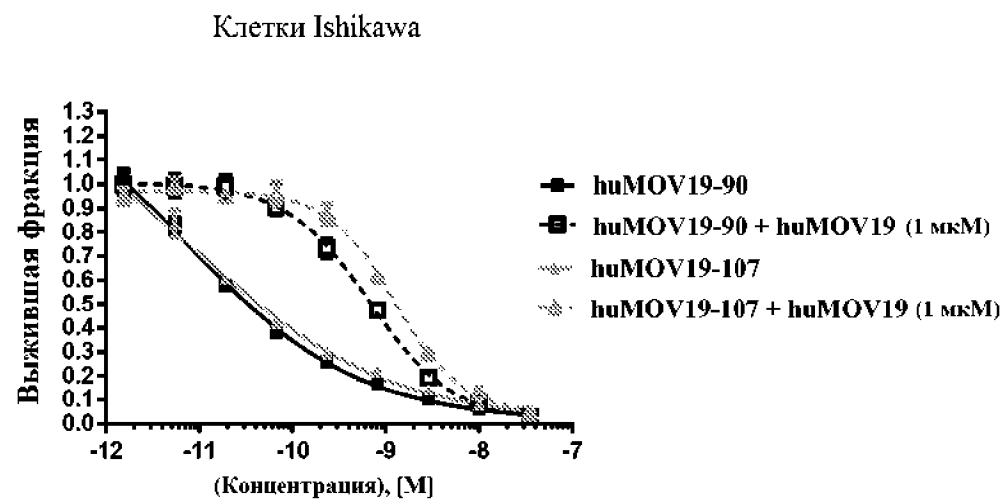


ФИГ. 19В

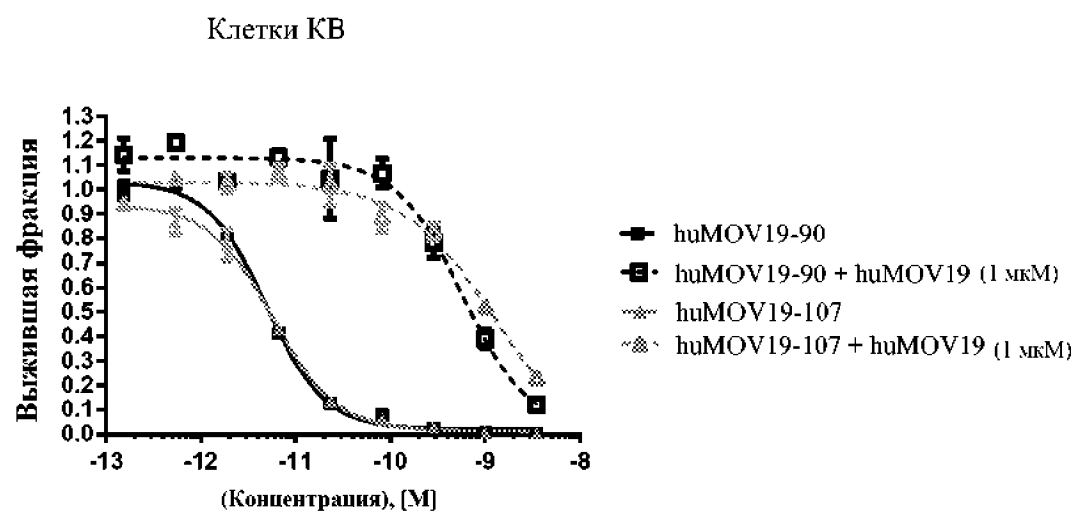


ФИГ. 20

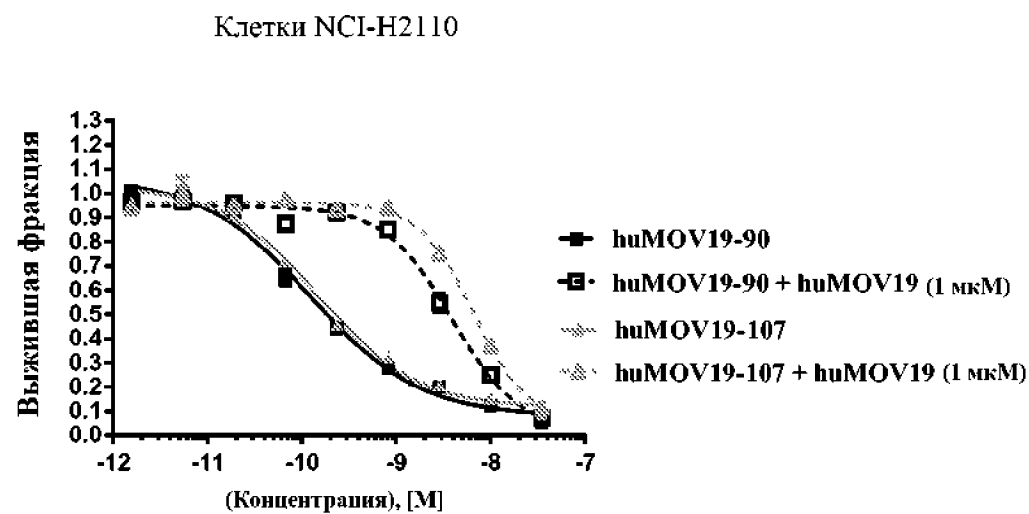
ФИГ. 21



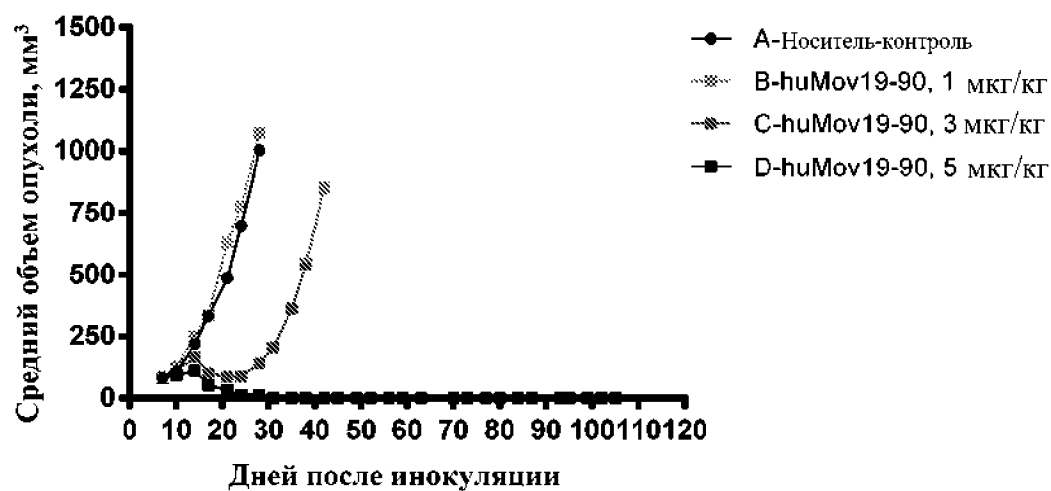
ФИГ. 21А



ФИГ. 21В

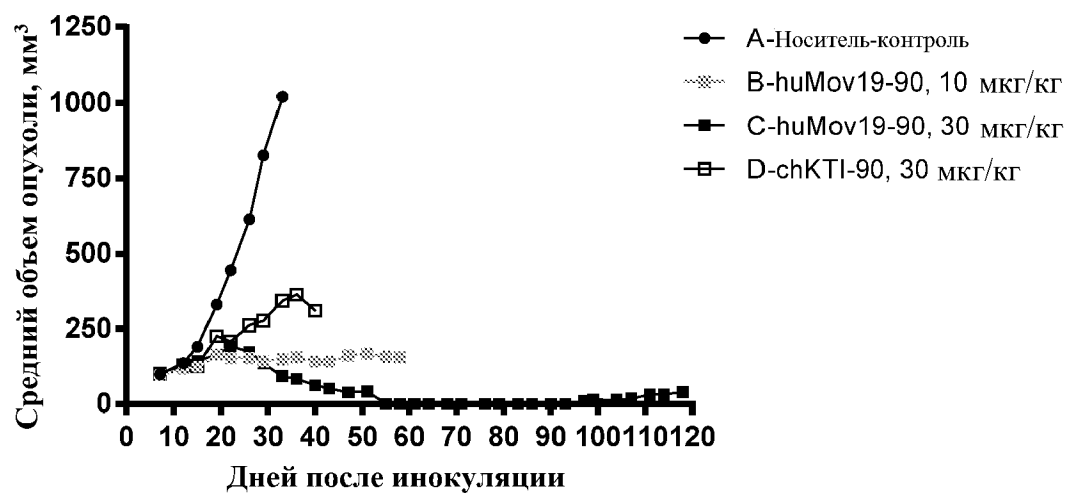


ФИГ. 21С



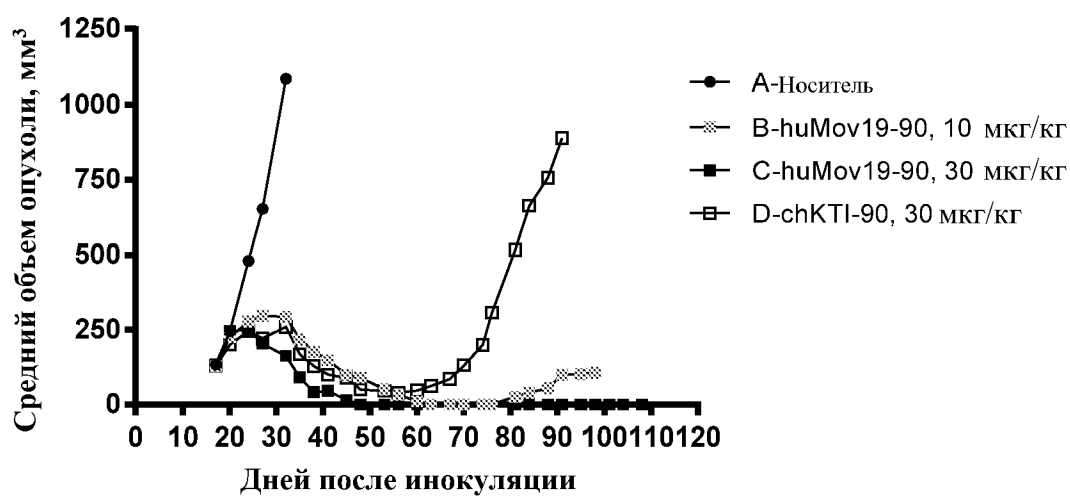
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	Т/С (День 24)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	—	—	—	—	—
B	huMov19-90	1	117%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMov19-90	3	13%	1/6	0/6	Активен
D	huMov19-90	5	2%	6/6	4/6	Высокоактивен

ФИГ. 22



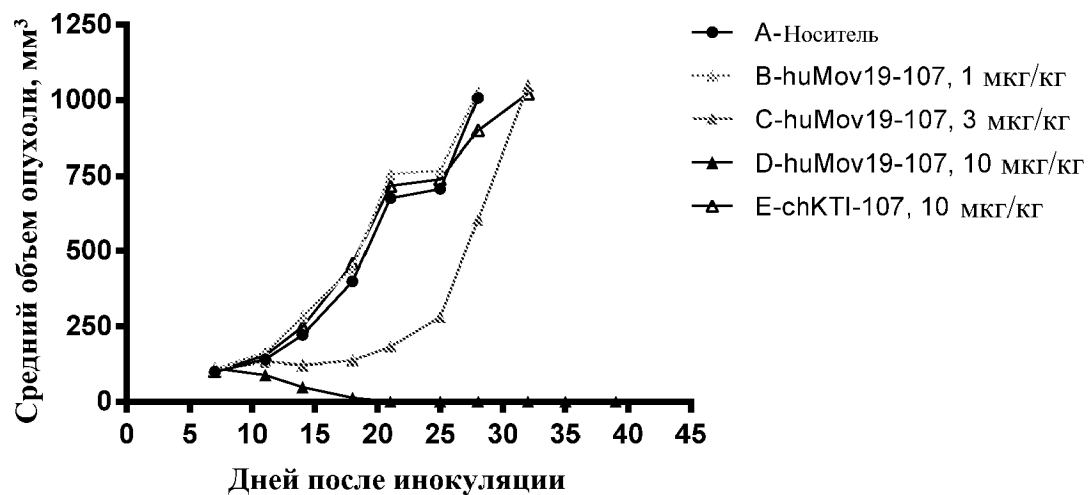
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	Т/С (День 33)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	10	15%	1/6	0/6	Активен
C	huMov19-90	30	9%	6/6	6/6	Высокоактивен
D	chKTI-90	30	34%	0/6	0/6	Активен

ФИГ. 23



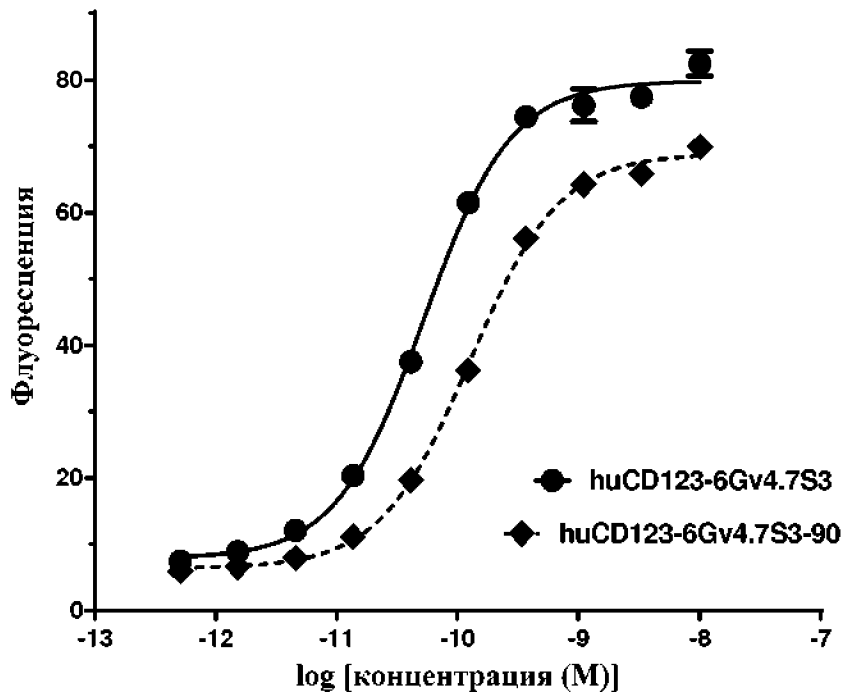
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	Т/С (День 32)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	-	-	-	-	-
E	huMov19-90	10	27%	6/6	6/6	Активен
F	huMov19-90	30	15%	6/6	6/6	Активен
G	chKTI-90	30	24%	4/6	0/6	Активен

ФИГ. 24



Группа лечения		Доза (мкг/кг)	Т/С (День 28)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	-	-	-	-	-
B	huMov19-107	1	102%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMov19-107	3	60%	1/6	1/6	Неактивен
D	huMov19-107	10	0%	6/6	6/6	Высокоактивен
E	chKTI-107	10	89%	0/6	0/6	Неактивен

ФИГ. 25



ФИГ. 26