



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |  |  |
|--|--|
| <p><b>(45)</b> Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2021.07.21</b></p> <p><b>(21)</b> Номер заявки<br/><b>201600191</b></p> <p><b>(22)</b> Дата подачи заявки<br/><b>2014.08.26</b></p> | <p><b>(51)</b> Int. Cl. <b>A61K 31/5365</b> (2006.01)<br/><b>C07D 413/14</b> (2006.01)<br/><b>A61K 47/48</b> (2006.01)<br/><b>A61P 29/00</b> (2006.01)<br/><b>A61P 37/00</b> (2006.01)<br/><b>A61P 35/00</b> (2006.01)</p> |
|--|--|

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРЫ  
МАКРОЛИДА, СПОСОБЫ ИХ СИНТЕЗИРОВАНИЯ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ  
ПРИМЕНЕНИЕ**

- (31)** 61/869,954; 61/934,313  
**(32)** 2013.08.26; 2014.01.31  
**(33)** US  
**(43)** 2016.07.29  
**(86)** PCT/US2014/052757  
**(87)** WO 2015/031396 2015.03.05  
**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**
- (72)** Изобретатель:  
**Ниттоли Томас, Джаин  
Нарешкумар Ф., Маркотан Томас  
Патрик (US)**
- (74)** Представитель:  
**Безрукова О.М. (RU)**
- (56)** WO-A1-2010126551  
 CN-A-103254311  
 WO-A2-2014089335  
 ROBERT Y. ZHAO ET AL.: "Synthesis and  
 Evaluation of Hydrophilic Linkers for Antibody-  
 Maytansinoid Conjugates", JOURNAL OF MEDICINAL  
 CHEMISTRY, vol. 54, no. 10, 26 May 2011 (2011-05-26),  
 pages 3606-3623, XP55046274, ISSN: 0022-2623, DOI:  
 10.1021/jm2002958 the whole document scheme 1  
 US-A1-2009068178

NATHAN FISHKIN ET AL.: "A novel pathway  
 for maytansinoid release from thioether linked antibody-  
 drug conjugates (ADCs) under oxidative conditions",  
 CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 47, no. 38, 1  
 January 2011 (2011-01-01), page 10752, XP055152687,  
 ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/c1cc14164c the whole  
 document

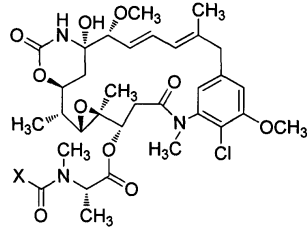
XIUXIA SUN ET AL.: "Design of Antibody-  
 Maytansinoid Conjugates Allows for Efficient  
 Detoxification via Liver Metabolism", BIOCONJUGATE  
 CHEMISTRY, vol. 22, no. 4, 20 April 2011 (2011-04-20),  
 pages 728-735, XP055096244, ISSN: 1043-1802, DOI:  
 10.1021/bc100498q the whole document

ERICKSON HANS K. ET AL.:  
 "ANTIBODY-MAYTANSINOID CONJUGATES ARE  
 ACTIVATED IN TARGETED CANCER CELLS  
 BY LYSOSOMAL DEGRADATION AND LINKER-  
 DEPENDENT INTRACELLULAR PROCESSING",  
 CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION  
 FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 8, 15  
 April 2006 (2006-04-15), pages 4426-4433, XP008074767,  
 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4489  
 the whole document

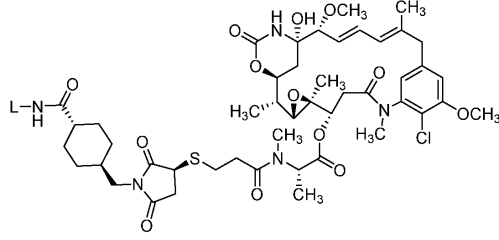
WAYNE C. WIDDISON ET AL.: "Semisynthetic  
 Maytansine analogues for the targeted treatment of cancer",  
 JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN  
 CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 49, no. 14, 13 July  
 2006 (2006-07-13), pages 4392-4408, XP002679529,  
 ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM060319F [retrieved on  
 2006-06-10] the whole document

WO-A2-2009117277

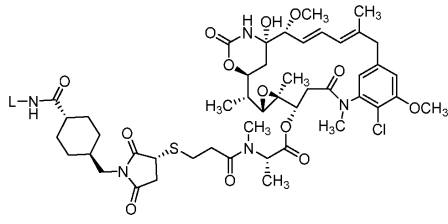
- (57)** Изобретение касается композиций, включающих диастереомерные соединения с формулой I, формулой IIa, формулой IIb, демонстрирующих улучшенный терапевтический профиль в контексте ингибированной пролиферации клеток, по сравнению с соответствующими композициями, включающими смесь диастереомеров. Изобретение далее описывает конъюгат лиганда с лекарственным препаратом, сформированным с использованием диастереомера макролида. Изобретение также описывает новый способ получения диастереомеров макролида и их терапевтическое применение.



I



IIa



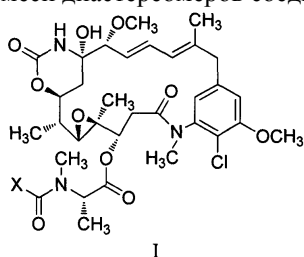
IIb

Пролиферативные заболевания характеризуются неконтролируемым ростом и распространением аномальных клеток. Если распространение этих клеток не контролируется, заболевание может привести к смерти. Пролиферативные заболевания, например рак, могут лечиться хирургическим путем, радиотерапией, химиотерапией, гормонотерапией и/или иммунотерапией. Многие такие стратегии лечения, особенно химиотерапия, основываются на использовании антипролиферативных препаратов, ограничивающих распространение аномальных клеток. Антипролиферативные препараты, однако, как правило, неразборчивы в способности уничтожать клетки, поражая нормальные и аномальные клетки, основываясь только на том, реплицируется ли клетка. Тем не менее, большинство антипролиферативных препаратов требует относительно высокой концентрации в месте действия пролиферации аномальной клетки для эффективного воздействия. Именно такой комбинации обеспечения достаточного антипролиферативного лекарственного препарата на месте роста аномальных клеток, также не вызывая значительную гибель нормальных клеток системно или вблизи таких клеток, касается настоящее изобретение.

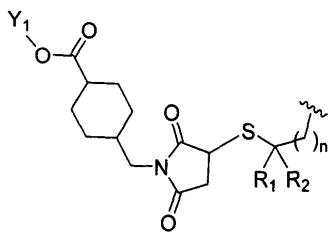
Различные подходы к целенаправленной доставке лекарственных средств были опробованы, включая использование конъюгатов для доставки препарата в область опухоли (таких как антитела или факторы роста) с токсинами, такими как *Pseudomonas*, или токсины дифтерии. Конъюгаты для использования в лечении рака, таким образом, доставляют антипролиферативное лекарственное средство к популяции аномальных клеток. С недавних пор конъюгаты, которые включают токсин майтанзин, используются для лечения рака. Майтанзин продемонстрировал большую эффективность как антипролиферативный агент, но токсичность казалась проблемой для нормальных клеток. Существует необходимость в разработке конъюгатов на основе майтанзина, которые имеют достаточную активность для использования в терапии рака. Чем более активный или эффективный конъюгат на основе майтанзина при ингибировании или уничтожении популяции аномальных клеток, тем ниже концентрация конъюгата требуется, при этом преимущество состоит в снижении общего риска повреждения нормальных клеток.

Многие антипролиферативные композиции имеют асимметричные структуры, такие как семья майтанзиноидов макролидов, и может существовать в форме рацемической смеси, в форме отдельных энантиомеров с конфигурацией "R" и "S" или (+) и (-) на стереогенный центр, и различных диастереомеров. Настоящее изобретение показывает, что целенаправленная доставка единственного диастереомера майтанзиноида усиливает ингибирование пролиферации клеток по сравнению с доставкой соответствующей смеси диастереомеров. Поэтому диастереомеры в соответствии с вариантами, описанными в настоящем документе, могут использоваться для подготовки лекарственных препаратов с улучшенным терапевтическим профилем, который может быть полезен для лечения определенных заболеваний и состояний, в частности рака.

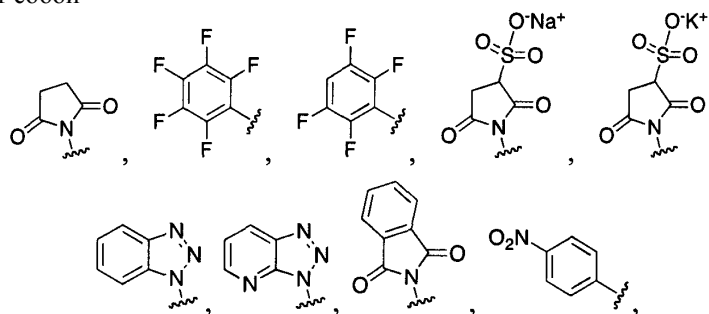
Настоящее изобретение касается смеси диастереомеров соединения формулы I



где X представляет собой



Y<sub>1</sub> представляет собой



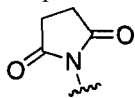
или H;

$R_1$  и  $R_2$  независимо выбираются из H или  $C_1$ - $C_{10}$ -алкила и

$n$  равен 1;

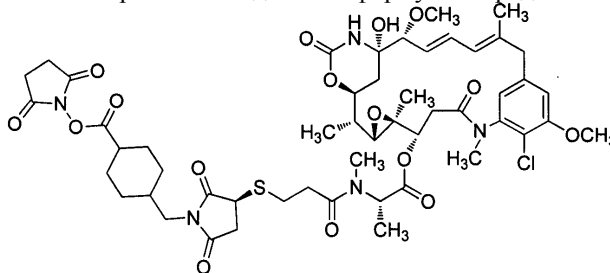
где соединение формулы I представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

В варианте осуществления изобретения  $Y_1$  представляет собой

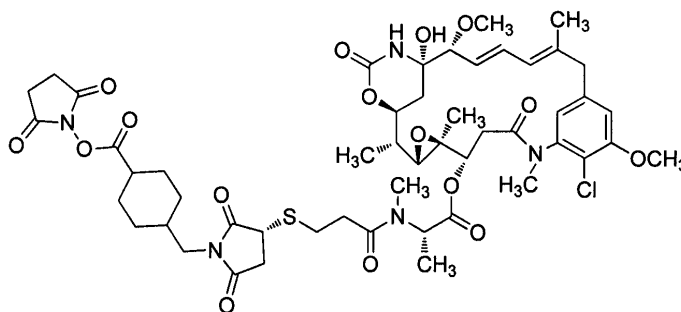


В варианте осуществления изобретения  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой H.

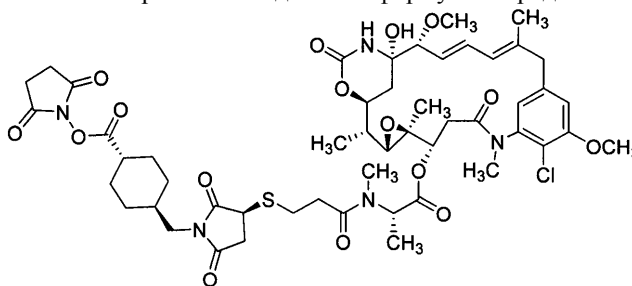
В варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой



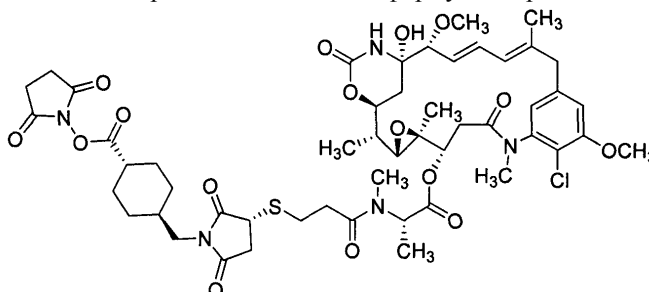
или



В варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой

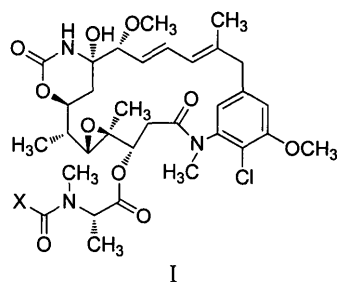


В варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой

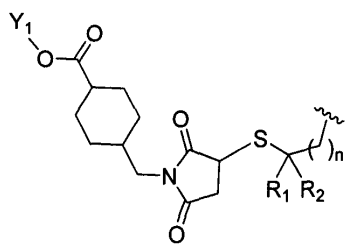


В варианте осуществления изобретения диастереомерный избыток в смеси составляет не менее 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы формулы I.

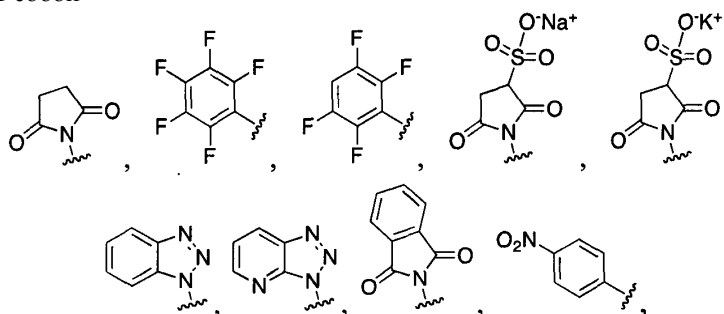
Настоящее изобретение также относится к диастереомеру соединения формулы I



где X представляет собой



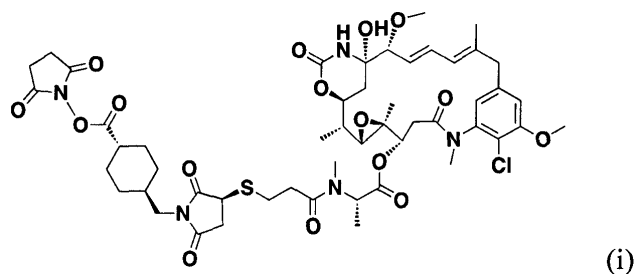
Y<sub>1</sub> представляет собой



или H;

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбираются из H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила и n равняется 1.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (i)



где соединение является стереомерно чистым.

Настоящее изобретение касается композиций, включающих множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где молекулы лекарственного препарата, существующие в композиции, включают смесь, как минимум, двух диастереомеров, первого диастереомера и второго диастереомера, далее где указанный первый диастереомер и второй диастереомер являются идентичными, за исключением того, что указанные первый и второй диастереомеры имеют различную стереохимическую конфигурацию в хиральном углероде, и указанный первый или второй диастереомер присутствует в диастереомерном избытке в количестве, превышающем 50%.

В одном варианте изобретение описывает композиции, включающие множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где n равняется 1, а R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, каждый независимо, является водородом.

В другом варианте композиция, включающая множество молекул лекарственного препарата с формулой I, присутствует в композиции в диастереомерном избытке приблизительно 60, 70, 80%, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

В определенных вариантах молекулы лекарственного препарата с формулой I присутствуют в композиции в диастереомерном избытке приблизительно от 90% приблизительно до 100%, или приблизительно от 95% приблизительно до 100%, или приблизительно от 98% приблизительно до 100%.

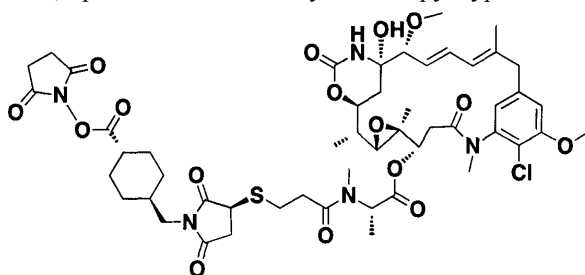
В другом варианте композиция включает множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где один по крайней мере из двух диастереомеров характеризуется спектром <sup>1</sup>H NMR на фиг. 1.

Как используется здесь, термин "приблизительно", когда используется в отношении определенного числового обозначения, означает, что значение может изменяться от указанного значения не более чем на 1%. Например, как используется в настоящем документе, выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т.д.).

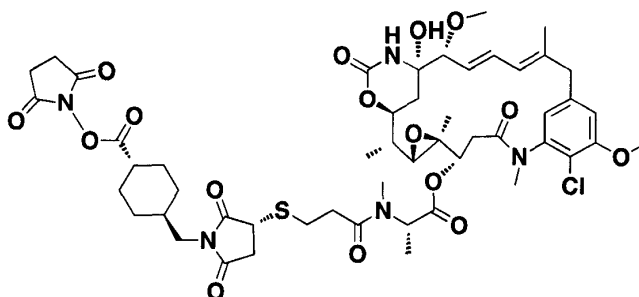
В другом варианте изобретение предусматривает композиции, включающие множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где молекулы лекарственного препарата присутствуют в композиции в диастереомерном избытке больше чем 50% и демонстрируют большую антипролиферативную активность, чем соответствующая композиция, включающая молекулы лекарственного препарата с формулой I, которые не присутствуют в диастереомерном избытке больше чем 50%.

Далее изобретение предусматривает композиции, включающие множество молекул лекарственного препарата с формулой I, далее включающие терапевтически эффективное количество второго или дополнительного агента, включая, например, химиотерапевтического агента, противовоспалительного агента, антибиотика и т.п.

Вариант изобретения предусматривает композиции, включающие множество молекул лекарственного препарата с формулой I, представленные следующей структурой:

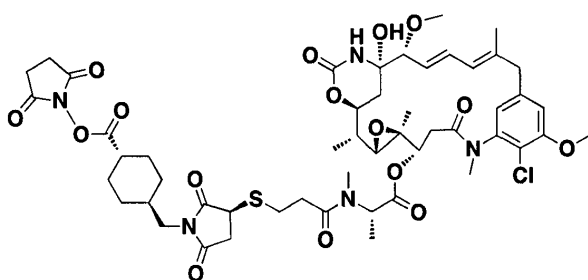


или



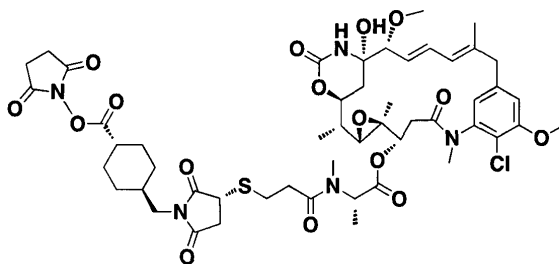
или их смеси в диастереомерном избытке больше чем 50%.

В одном варианте изобретения один по крайней мере из двух диастереомеров является соединением с формулой (i)



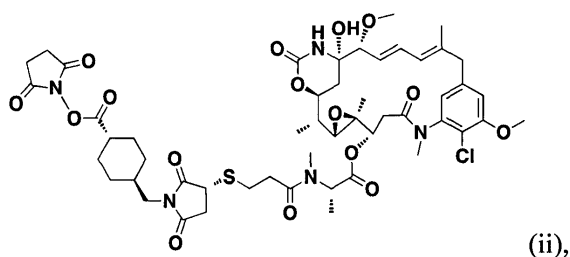
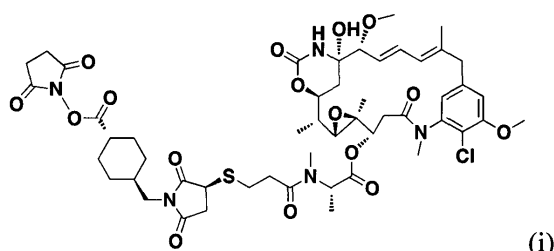
(i).

В другом варианте один по крайней мере из двух диастереомеров является соединением с формулой (ii)



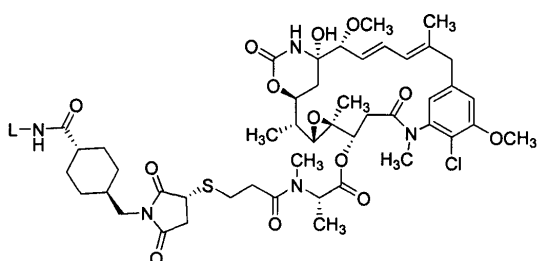
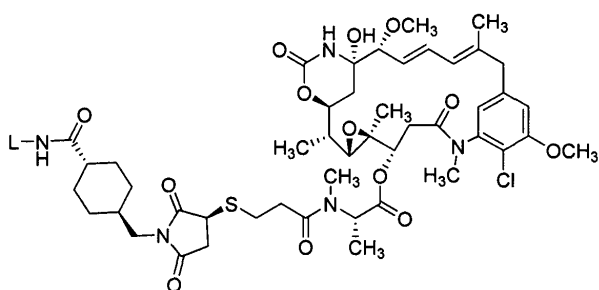
(ii).

Настоящее изобретение также описывает соединение с формулой (i) или (ii)



где соединение является стереомерно чистым.

Настоящее изобретение также описывает диастереомерную смесь, включающую соединения формулы IIa и IIb

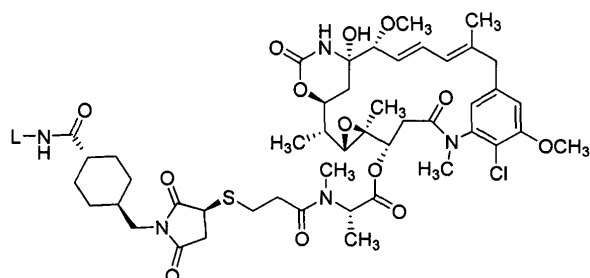


где L представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент; и где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

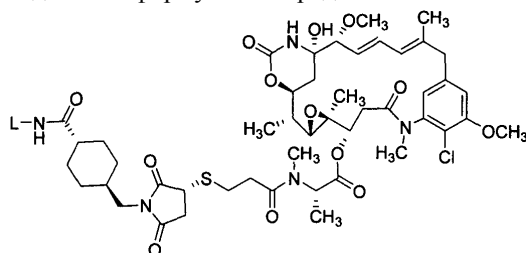
В варианте изобретения L представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связывают опухоль-ассоциированный антиген, выбранный из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, OLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

В варианте изобретения опухоль-ассоциированный антиген выбирается из группы, содержащей EGFRvIII, Her2, и Muc16.

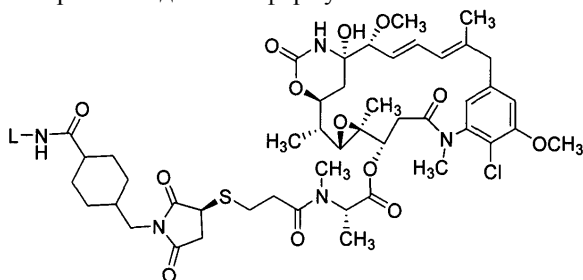
В варианте изобретения соединение формулы Ia или Ib представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле Ia или Ib. В варианте изобретения соединение формулы Ia представляет собой



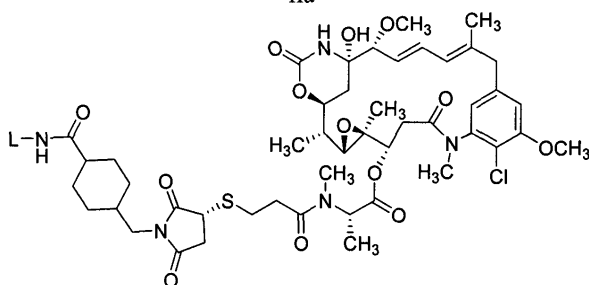
В варианте изобретения соединение формулы Ib представляет собой



Настоящее изобретение также относится к антипролиферативной фармацевтической композиции, содержащей смесь диастереомерных соединений формулы Ia или Ib



Ia

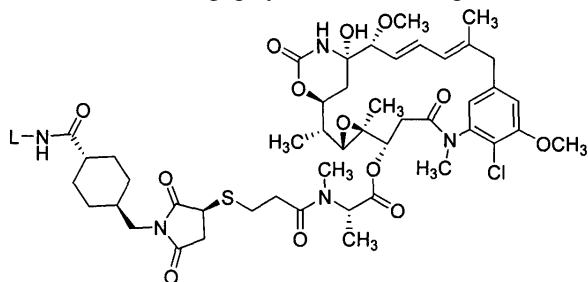


Ib

и фармацевтически приемлемый наполнитель,

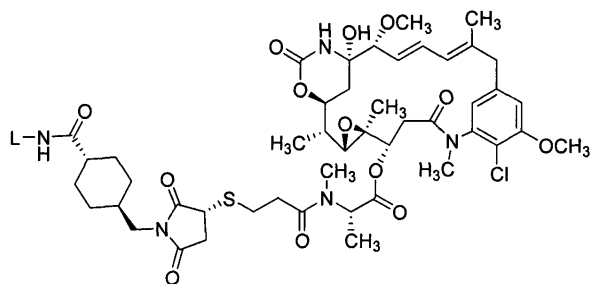
где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом и соединение формулы Ia или Ib представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле Ia или Ib.

В варианте изобретения соединение формулы Ia или Ib представляет собой



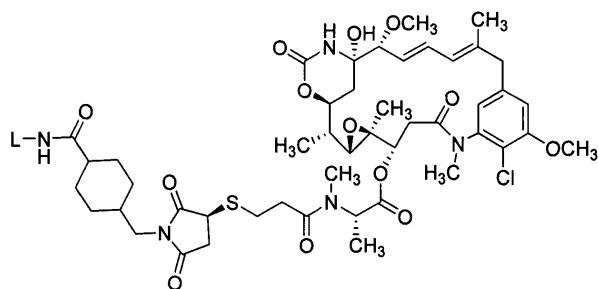


ИЛИ

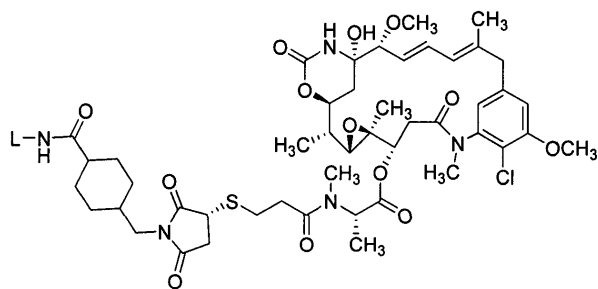


В варианте изобретения соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

Настоящее изобретение также описывает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с опухоль-ассоциированным антигеном, который выбирается из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу, и уроплакин-3; где способ заключается в введении терапевтически эффективного количества диастереомерной смеси соединений формулы IIa или IIb



IIa



IIb

где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, связывающим указанный опухоль-ассоциированный антиген, и где соединение представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

В некоторых вариантах антителом или антиген-связывающим фрагментом имеет последовательности аминокислот, отличающиеся от вышеупомянутых антител, но сохраняющие способность к связыванию соответствующего опухоль-ассоциированного антигена. Такие различные антитела и фрагменты антитела могут включать одно или несколько дополнений, делеций или замен аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, которая по сути эквивалентна активности описанных антител.

Два конъюгата считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, уровень и степень поглощения которых не де-

монстрируют значительную разницу при введении в той же молярной дозе при подобных экспериментальных условиях, как при однократной так и при многократной дозе. Некоторые конъюгаты считаются эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они будут эквивалентны в степени поглощения, но не в темпе поглощения, и все же смогут считаться биоэквивалентными, потому что такие различия в темпе поглощения являются намеренными и отражены в маркировке, не являются важными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном использовании и считаются с медицинской точки зрения незначительными для определенного изученного фармацевтического продукта.

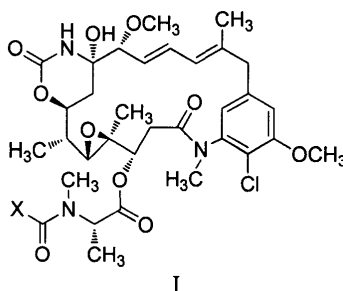
В одном варианте два конъюгата являются биоэквивалентными при отсутствии клинически значимых различий в безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте изобретения два конъюгата являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз переключаться между исходным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных последствий, включая клинически существенное изменение в иммуногенности или уменьшенную эффективность, по сравнению с продолжительной терапией без такого переключения.

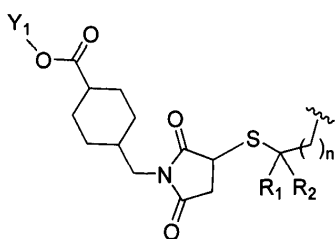
В одном варианте изобретения два конъюгата являются биоэквивалентными, если они оба имеют одинаковый механизм действия или механизм действия является таковым, что условия использования таких механизмов известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и *in vitro* способами. Меры по биоэквивалентности включают, например, (a) *in vivo* анализ у людей или других млекопитающих, у которых концентрация конъюгатов или их метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) *in vitro* анализ, который был скоррелирован и является довольно прогнозируемым по данным о биодоступности *in vivo* у человека; (c) *in vivo* анализ у людей или других млекопитающих, у которых надлежащий острый фармакологический эффект конъюгата (или его мишень) измеряется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, устанавливающем безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность конъюгата.

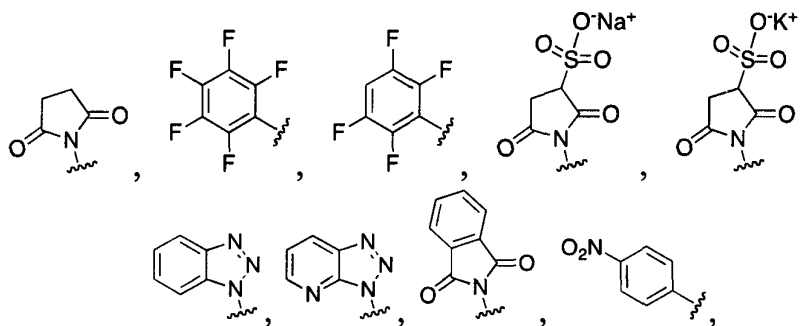
Настоящее изобретение также описывает новый способ приготовления смеси диастереомеров соединения с формулой (I)



где X представляет собой



Y<sub>1</sub> представляет собой



или H;

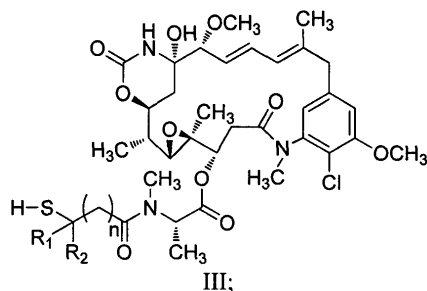
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбираются из H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила и

n равен 1;

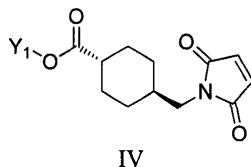
процесс, включающий этапы:

(a) обеспечение взаимодействия

(i) соединения формулы III



(ii) соединения формулы IV



(iii) силикагеля и

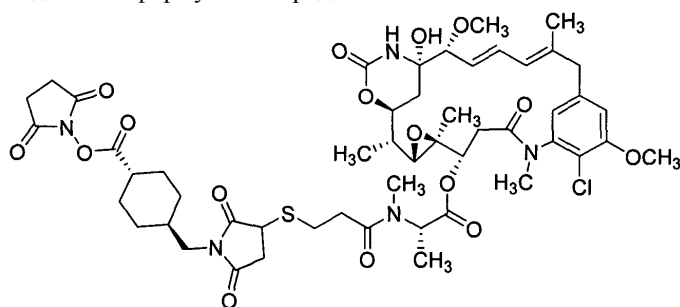
(iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду; и

(b) выделение соединения формулы I, представленного в диастереомерном избытке, превышающем 50%, где диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

В варианте изобретения органический растворитель содержит полярный апротонный растворитель. В варианте изобретения полярный апротонный растворитель содержит ацетонитрил. В варианте изобретения органический растворитель и вода присутствуют в объемной пропорции от приблизительно 1:1 до приблизительно 4:1 или от приблизительно 1:1 до приблизительно 10:1.

В варианте изобретения молярная пропорция соединения с формулой III и соединения с формулой IV составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3.

В варианте изобретения n равен 1, и R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, каждый независимо, представляет собой водород. В варианте изобретения соединение формулы III представляет собой

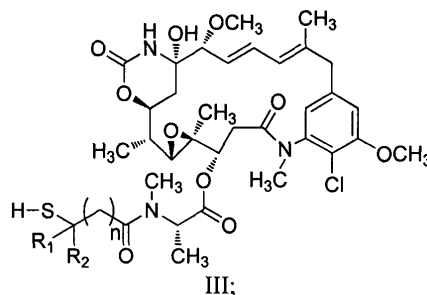


где процесс включает на этапе (a) обеспечение взаимодействия в атмосфере аргона.

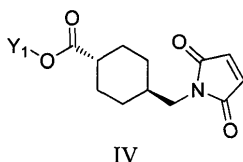
В варианте изобретения процесс включает на этапе (a) перемешивание соединения формулы III, соединения формулы IV; силикагеля, растворителя, включающего органический растворитель, и воды.

В варианте изобретения процесс после этапа (a) и перед этапом (b) включает (c) добавление

(i) соединения формулы III



(ii) соединения формулы IV



(iii) силикагеля и

(iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду; и

(d) обеспечение взаимодействия соединения формулы III, соединения формулы IV, силикагеля и растворителя, включающего органический растворитель и воду; при этом  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбраны из H или  $C_1$ - $C_{10}$ -алкила и  $n$  равен 1.

В варианте изобретения процесс включает в себя на этапе (с) выделение соединения с формулой I путем фильтрации. В варианте изобретения фильтрация производится посредством целита.

В варианте изобретения процесс дополнительно включает очистку соединения с формулой I посредством колоночной хроматографии на силикагеле. В варианте изобретения процесс дополнительно включает высушивание соединения с формулой I.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где способ далее включает этап (d), где далее этап (d) включает очищение соединения с формулой I, полученного на этапе (с), как описано выше.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где твердый субстрат выбирается из группы, состоящей из силикатного геля, целита, глинозема, цеолита и измельченных молекулярных сит. Другие подобные твердые субстраты могут также использоваться, если твердый субстрат допускает надлежащее расположение макролида III для осуществления стереоселективного дополнения из малеимида IV.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где  $n$  равняется 1 и  $R_1$  и  $R_2$ , каждый, является независимо водородом.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где органический растворитель включает полярный апротонный растворитель, такой как DMF, DMA, HMPT, NMP, ацетонитрил, диоксан, ацетон, DMSO, THF, этилацетат, метилацетат, метилхлорид, пропилен карбонат или их смеси.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где полярный апротонный растворитель включает ацетонитрил.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где органический растворитель и вода присутствуют в прямой пропорции от приблизительно 1:1 до приблизительно 4:1 или от приблизительно 1:1 до приблизительно 10:1.

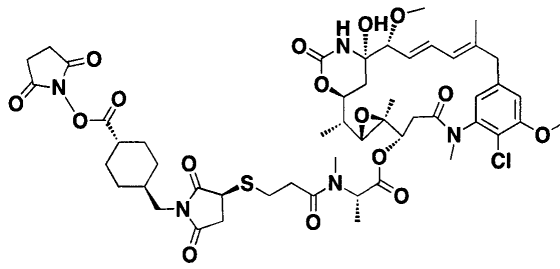
В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где молярная пропорция исходного материала, имеющего формулу III, и соединения с формулой IV составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3.

В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, далее включающее объединение соединения с формулой I с антителом или антиген-связывающим фрагментом, для создания конъюгата антитела с лекарственным препаратом.

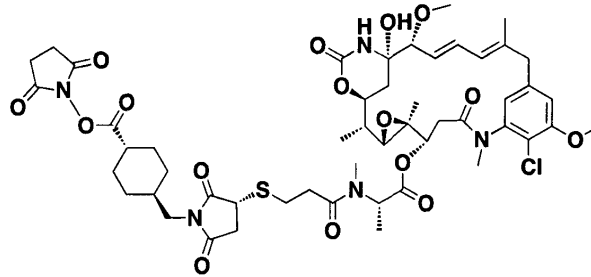
В определенных вариантах изобретение описывает способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где соединение с формулой I привязано к антителу или антиген-связывающему фрагменту через S, O или  $NR_3$ .

В варианте изобретения описан способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, где молекулы лекарственного препарата с формулой I присутствуют в композиции в диастереомерном избытке приблизительно 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

В варианте изобретения описан способ приготовления композиции, включающей множество молекул лекарственного препарата с формулой I, представленной следующей структурой:

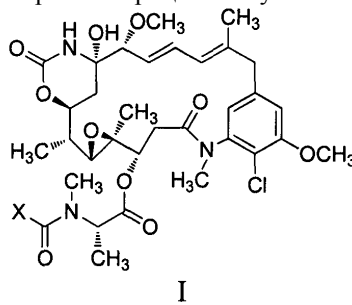


или

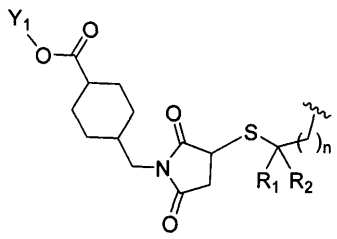


в диастереоселективном избытке больше чем 50%. Несмотря на то, что определенные примерные способы приготовления композиций согласно настоящему изобретению сформулированы в рабочих примерах в настоящем документе, в рамках настоящего изобретения рассматриваются другие способы, например хроматографическое разделение рацемической смеси или смеси диастереомеров (например, ВЭЖХ на нормальной, обратной или хиральной постоянной фазе с использованием полярных смесей апротонного растворителя и т.д.).

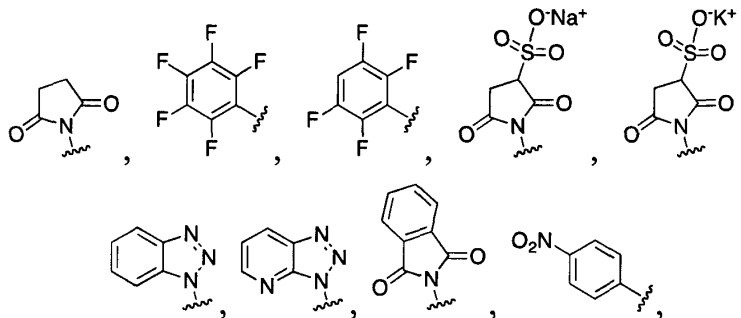
Настоящее изобретение также раскрывает процесс получения конъюгата соединения по формуле I



где X представляет собой



Y<sub>1</sub> представляет собой

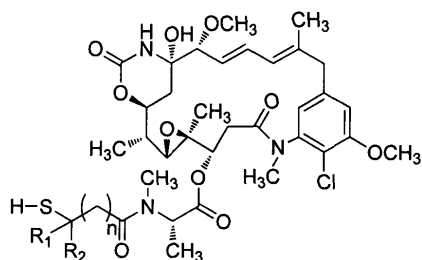


или H;

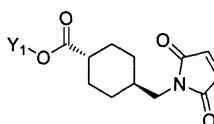
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбираются из H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила и n равен 1;

с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, при этом процесс включает следующие этапы:

- (a) взаимодействие  
(i) соединения формулы III



- (ii) соединения формулы IV

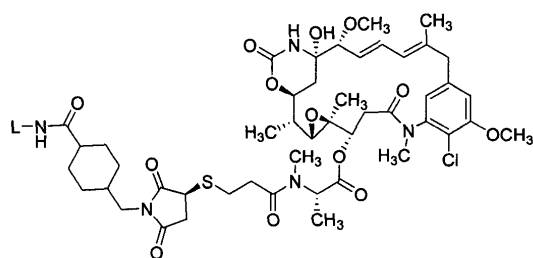


IV

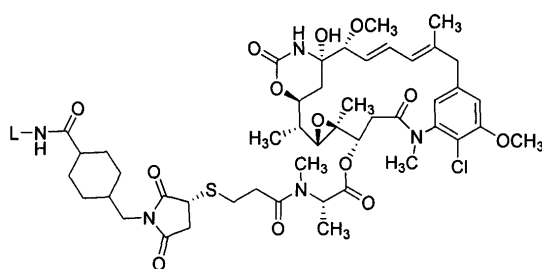
- (iii) силикагеля и  
(iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду;  
(b) обеспечение реакции между соединением формулы III с соединением формулы IV;  
(c) выделение соединения формулы I, представленного в диастереомерном избытке, превышающем 50%, где диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I; и  
(d) сочетание соединения формулы I и антитела или его антиген-связывающего фрагмента для создания антительного лекарственного конъюгата.

В варианте изобретения соединение формулы I прикреплено к антителу или антиген-связывающему фрагменту посредством S, O или NR<sub>3</sub>, при этом R<sub>3</sub> является H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилом.

Настоящее изобретение также относится к способу приготовления смеси диастереомерных соединений с формулой IIa и IIb



IIa

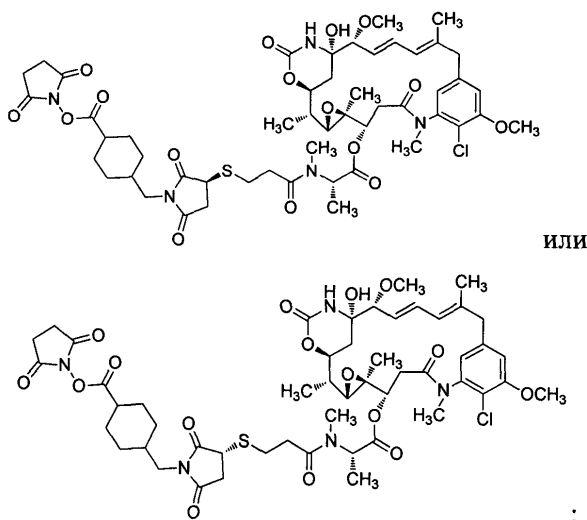


IIb

где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом; и  
где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на смеси, содержащей по меньшей мере два диастереомера, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb,

при этом процесс включает

- (a) реакцию Лиганда, L, с соединением формулы I, где соединение представляет собой



где соединение формулы I представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I; и

(b) очищение соединения формулы Ia или Ib.

Настоящее изобретение также касается композиций, где множество молекул лекарственного препарата с формулой I или конъюгаты лиганда с лекарственным препаратом с формулой II содержатся в композиции в терапевтически эффективном количестве и дополнительно включает фармацевтически приемлемый разжижитель, носитель или наполнитель.

В варианте изобретения описаны композиции, включающие множество молекул лекарственного препарата с формулой II, далее включающие терапевтически эффективное количество второго химиотерапевтического агента.

В многочисленных вариантах изобретения композиции включают соединение с формулой I и/или II из настоящего изобретения, которое может использоваться в сочетании с одним или несколькими дополнительными соединениями или способами лечения. Совместное введение и комбинированная терапия не ограничиваются одновременным введением, отдельно или вместе, но также включают и последовательные введения.

Комбинированная терапия включает введение однократной дозы фармацевтической лекарственной формы, содержащей композицию, включающую одно или несколько соединений с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib и один или несколько других терапевтических агентов; а также введение композиции, включающей соединение с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib из настоящего изобретения, и один или несколько дополнительных агентов в собственной отдельной фармацевтической дозированной лекарственной форме. Например, композиция, включающая соединение с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib и, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост, которые могут быть введены пациенту вместе в одной дозе композиции, например комбинированной форме, или каждый агент может быть введен по отдельности. В последнем случае композиция, включающая соединение с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib и один или несколько дополнительных агентов, может быть введена одновременно, или отдельно по этапам, т.е. последовательно.

Неограничивающие примеры таких дополнительных терапевтических агентов включают ингибиторы цитокина (например, интерлейкин-1 (IL-1) ингибитор (такие как рилонацепт или анакинра, антагонист малых молекул IL-1 или анти-IL-1 антитело); ингибитор IL-18 (такой как антагонист малых молекул IL-18 или анти-IL-18 антитело); ингибитор IL-4 (такой как антагонист малых молекул IL-4, анти-IL-4 антитело или анти-IL-4 антитело рецептора); ингибитор IL-6 (такой как антагонист малых молекул IL-6, анти-IL-6 антитело или антитело рецептора анти-IL-6); аспирин; NSAID; стероиды (например, преднизон, метотрексат и т.д.); циклоспорин A низкой дозы; ингибиторы фактора некроза опухоли (TNF) или рецептора TNF (например, антагонист малых молекул TNF или TNFR или анти-TNF или TNFR антитело); ингибиторы синтеза мочевой кислоты (например, аллопуринол); промоутеры экскреции мочевой кислоты (например, пробенецид, сульфинпиразон, бензбромарон и т.д.); другие ингибиторы воспаления (например, ингибиторы каспазы-1, p38, IKK1/2, CTLA-4Ig и т.д.); и/или кортикостероиды. Дополнительный терапевтический агент(ы) может быть введен до, одновременно или после введения одного или более соединений с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib (в целях настоящего изобретения такие режимы введения считаются введением одного или нескольких соединений с формулой I и/или формулой Ia и/или формулой Ib "в комбинации с" терапевтическим агентом).

Термин "цитотоксический агент", как используется в настоящем документе, относится к веществу, ингибирующему или предотвращающему функцию клеток и/или вызывающему деструкцию клеток. Термин охватывает радиоактивные изотопы (например,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  и  $Re^{186}$ ), химиотерапевтические агенты и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты.

"Химиотерапевтическое вещество" является химическим соединением, используемым в лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan®); алкильные сульфаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа, и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметилмеламин; хлорметины, например хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, предни-мустин, трофосфамид, урамустин; нитромочевина, такая как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, лому-мустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, отрамицин, аза-серин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромоми-цины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпиру-бицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомиицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, три-метрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, триамиприн, тиогуанин; пири-мидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиу-ридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; антиадреналы, такие как аминоклотетимид, мито-тан, трилостан; средства, восполняющие недостаток фолиевой кислоты, такие как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамоп; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндизин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; араби-нозид; ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) и доцетаксел (TAXOTER®, Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемци-табин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорел-бин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклотетимид; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингиби-тор топоизомеразы RFS2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эспермицины; капе-цитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанного. Также в настоящее определение включают антигормональные агенты, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамокси-фен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеок-сифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производ-ные любого из вышеуказанного.

"Ингибирующий рост агент", когда используется в настоящем документе, относится к соединению или композиции, ингибирующей рост клеток, особенно раковых клеток, *in vitro* или *in vivo*. Примеры ингибирующих рост агентов включают агенты, блокирующие прогрессию клеточного цикла (в месте, не являющемся фазой S), например, агенты, вызывающие блокировку G1 и блокировку M-фазы. Классиче-ские блокаторы M-фазы включают барвинки (винкристин и винбластин), TAXOL® и топо II ингибито-ры, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Такие агенты, которые блокируют G1, также влияют на блокирование S-фазы, например алкилирующие агенты ДНК, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C.

Настоящее изобретение также описывает фармацевтические композиции. Такие композиции вклю-чают терапевтически эффективное количество активного вещества и фармацевтически приемлемый но-ситель. Термин "фармацевтически приемлемый" означает утвержденный контролирующим органом Фе-дерального правительства США или правительства штата, или перечисленный в Фармакопее США или другой признанной фармакопее, для использования у животных и, в частности, у людей. Термин "носи-тель" относится к разжижителю, вспомогательному веществу, наполнителю или лекарственной среде, с которой вводится лекарственный препарат. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, включая масла животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п.



Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикатный гель, стеарат натрия, глицеринмоноостеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, вода, этанол и т.п. Композиция при желании может также содержать незначительное количество смачивающих или эмульгирующих веществ или буферных веществ рН фактора. Такие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, лекарственных форм с контролируемым высвобождением и т.п. Композиция может быть в форме суппозитория, с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Форма для орального применения может включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннитола, лактозы, крахмала, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Э.В. Мартин.

В варианте изобретения композиция формулируется в соответствии с обычными практиками как фармацевтическая композиция, адаптированная к внутривенному введению человеку. При необходимости, состав может также включать агенты растворения и локальное анестезирующее средство, такое как лидокаин, для снятия боли в месте инъекции. Если композиция вводится инфузионно, она может поставляться из флакона для инфузии, содержащего стерильную воду фармацевтического сорта или солевой раствор. Если композиция вводится инъекционно, ампула со стерилизованной водой для инъекции или солевым раствором может быть предусмотрена, чтобы компоненты могли быть смешаны до введения.

Активные вещества согласно настоящему изобретению могут быть нейтральными или иметь форму солей. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, сформированные со свободными аминогруппами, например, полученными из соляных, фосфорических, уксусных, щавелевых, виннокаменных кислот и т.д., и соли, сформированные со свободными карбоксильными группами, например, полученными из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Количество активного вещества согласно настоящему изобретению, который будет эффективным при лечении заболевания, может быть определен стандартными клиническими способами на основе настоящего описания. Кроме того, анализы *in vitro* могут произвольно применяться, чтобы идентифицировать оптимальные диапазоны дозировки. Точная доза, которая будет использоваться в лекарственной форме, будет также зависеть от пути введения и степени тяжести и определяется согласно суждению врача и обстоятельствам каждого пациента. Однако подходящие диапазоны дозировки для внутривенного введения обычно приблизительно от 0,5 до 20 мг активного соединения на 1 кг массы тела. Подходящие диапазоны дозировки для интраназального введения являются приблизительно от 0,01 мг/кг на 1 кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы могут экстраполироваться из кривых доза-эффект, полученных из испытаний *in vitro* или тестовых систем животных моделей.

В одном варианте изобретения описан способ лечения заболевания у пациента, страдающего от заболевания, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, включающей соединение с формулой (I) и/или (II), и далее включающий введение поэтапно или последовательно дополнительной терапии или введение по крайней мере одного дополнительного терапевтического агента.

В другом варианте изобретения раскрывается способ лечения заболевания, чувствительного к воздействию указанным способом, причем указанный способ включает парентеральное введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества композиции, включающей соединение с формулой I и/или формулой II и/или формулой III.

Настоящее изобретение далее предусматривает использование любой из композиций, содержащих соединения с формулой I и/или формулой II и/или формулой III, формулой (i), формулой (ii) или их комбинации, и/или их фармацевтические лекарственные формы при изготовлении препарата для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности заболевания.

Заявленное изобретение далее предусматривает использование любой из композиций, содержащих соединения с формулой I, и/или формулой II, и/или формулой III, формулой (i), формулой (ii) или их комбинации и/или их фармацевтические лекарственные формы, при изготовлении препарата для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности опухоли.

В то время как варианты, описанные в настоящем документе, были преимущественно описаны в отношении антипролиферативных нарушений, таких как рак, предполагается, что композиции могут также использоваться при лечении заболевания, выбранного из ряда аутоиммунных заболеваний и других иммунологических расстройств и дисфункций, воспалительных заболеваний, инфекционных заболеваний, нейродегенеративных заболеваний, заболеваний костей и сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, любое нарушение, которое может извлечь выгоду из предназначенной доставки токсичного вещества к определенным клеткам, типам клеток, тканей и/или органов в рамках данного изобретения.

Наконец, варианты, описанные в настоящем документе, могут включать композиции, включающие смеси соединений, представленных формулой I, и/или формулой II, и/или формулой III.

Ссылки на определенные варианты, сделанные в следующем описании, приведены только для иллюстрации принципов настоящего изобретения. Кроме того, поскольку многочисленные модификации и изменения легко очевидны для специалистов в отрасли, настоящее изобретение не ограничено описани-

ем конкретных структур и процессов, как описано в настоящем документе. Соответственно, все подходящие модификации и эквиваленты могут рассматриваться в рамках настоящего изобретения и как определено прилагаемой формулой изобретения.


Слова "включают", "включение", "в том числе" и "включая", когда используется в настоящей спецификации и в прилагаемой формуле изобретения, определяют наличие установленных свойств, целых чисел, компонентов или этапов, но не устраняют наличие или добавление одной или нескольких дополнительных свойств, целых чисел, компонентов или этапов.

Общие термины, использованные в любом из вариантов, описанных в настоящем документе, могут быть определены соответствующим образом; однако заявленное значение не должно интерпретироваться как ограничение объема термина по сути.

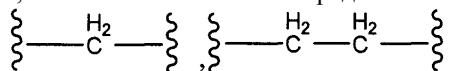
Термин "конъюгат", как используется в настоящем документе, относится к соединению, имеющему лиганд, линкер и биологически активную молекулу. Иллюстративные примеры включают композиции с формулой (II).

Термин "спейсер", как используется в настоящем документе, относится к химическим элементарным звеньям линкера, используемым для пространственного разделения лиганда от биологически активной молекулы и для обеспечения катаболизма линкера в клетках.

Термин "макролид", как используется в настоящем документе, относится к любой биологически активной молекуле, имеющей кольцо макролида.

Символ  обозначает точки крепления.

Термин "алкил", как используется в настоящем документе, относится к радикалу углеводорода, имеющему нормальную или разветвленную цепь или их комбинацию. Алкильные радикалы могут быть одновалентным, бивалентным или циклическими радикалами. Примеры одновалентных алкильных радикалов: метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, n-бутил, изобутил, sec-бутил, t-бутил, пентил, неопентил, гексил, изогексил и т.п. Для примера, бивалентный алкильный радикал включает



Примеры циклических алкильных радикалов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п. Типичные алкильные радикалы имеют от одного до десяти атомов углерода, одного-девяти атомов углерода, одного-восьми атомов углерода, одного-семи атомов углерода, одного-шести атомов углерода, одного-пяти атомов углерода, одного-четырёх атомов углерода, одного-трех атомов углерода, одного-двух атомов углерода или одного атома углерода. Типичный циклоалкил имеет от 3 до 7 радикалов моноциклического ядра.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль", как используется в настоящем документе, относится к органическим и неорганическим солям соединений конъюгатов, описанных здесь, например соединений с формулой (I) и (II). Соли фармацевтически приемлемы и включают сульфат, цитрат, нитрат, фосфат, аскорбат, бромид, глюконат, бензоат, оксалат, пантотенат и т.д. Обратите внимание на то, что фармацевтически приемлемые соли, описанные в настоящем документе, могут включать больше одного заряженного атома в структуре, а также один или несколько противоположно заряженных ионов. Приготовление соединений конъюгатов, как фармацевтически приемлемых солей, известно специалистам в отрасли.

Термин "лиганд", как используется в настоящем документе, означает любую молекулу или соединение, которое в частности или выборочно взаимодействует и/или связывается со второй молекулой или соединением. В определенных вариантах лиганд является антителом или частью антитела, связанной антигеном. Другие примеры лигандов, подходящих для использования в контексте настоящего изобретения, включают, например, аптамеры, пептиды, в частности, взаимодействующие с определенным антигеном (например, пептид-ассоциированное антитело), молекулы рецептора и антигенсвязывающие матрицы (например, DARPIn, повторы HEAT, повторы ARM, тетратрикопептидные повторы и другие матрицы на основе естественных повторов и т.д. [см., например, Voersma и Pluckthun, 2011, Curt. Opin. Biotechnol. 22:849-857 и ссылки, процитированные там]).

Антитела существуют как интактные иммуноглобулины или как ряд хорошо охарактеризованных фрагментов, произведенных гликозированием различных пептидаз. Например, пепсин гликолизует антитело ниже двусернистых связей в шарнирной области для производства F(ab)<sub>2</sub>, димера Fab, который сам является легкой цепью, соединенной с V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub> через дисульфидную связь. F(ab)<sub>2</sub> может быть уменьшен при умеренных условиях, чтобы нарушить двусернистую связь в шарнирной области, таким образом преобразовав F(ab)<sub>2</sub> димер в Fab' мономер. Fab' мономер по сути является Fab с частью шарнирной области. В то время как различные фрагменты антитела определяются с точки зрения гликолизирования интактного антитела, специалисту в отрасли очевидно, что такие фрагменты могут быть синтезированы заново, химически или при помощи рекомбинантных методов ДНК. Таким образом, термин антитело, как используется в настоящем документе, также включает фрагменты антитела, произведенные модификацией целых антител или синтезируемых заново с использованием рекомбинантных методов ДНК (например, одинарные участки варибельности (Dab) отдельной цепи Fv (scFv)), или фрагменты, идентифицированные с использованием библиотеки данных, таких как библиотеки бактериофагов, E. coli или

дрожжей (см., например, McCafferty и др. (1990) Nature 348:552-554).

Способы получения антител известны из уровня техники. См., например, Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497; Harlow & Lane (1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Антитела, изолированные из организмов, кроме человеческих, таких как мыши, крысы, кролики, коровы, могут быть сделаны более схожими с человеческими антителам путем химеризации или гуманизации.

Термин "человеческое антитело", как используется в настоящем документе, включает антитела, имеющие переменные и константные участки, полученные из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческие mAbs согласно изобретению могут включать остатки аминокислот, не закодированные последовательностями человеческого иммуноглобулина (например, мутации, инициированные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR<sub>3</sub>. Однако термин "человеческое антитело", как используется в настоящем документе, не включает mAbs, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, были трансплантированы на человеческие последовательности FR.

Термин "терапевтически эффективное количество", как используется в настоящем документе, относится к количеству, оказывающему желаемое влияние, для которого такое количество было введено. Точное количество будет зависеть от цели лечения и определяется специалистом в отрасли с помощью известных способов (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Термин "рацемат", как используется в настоящем документе, означает эквимолекулярную смесь пары энантиомеров. Термин рацемат также относится к рацемической смеси.

Термин "энантиомер", как используется в настоящем документе, относится к соединениям, не совпадающим при наложении зеркальными отображениями друг друга. Энантиомеры могут существовать в конфигурации (R) или (S).

Термин "стереоселективный синтез" относится к химической реакции, которая приводит к формированию единственного стереоизомера или смеси изомеров, обогащенной энантиомерами, из двух или большего количества возможных стереоизомеров.

Термин "диастереомерный избыток" относится к различию между мольной фракцией желаемого единственного диастереомера в сравнении с остающимися диастереомерами в композиции. Диастереомерный избыток вычисляется следующим образом:

(Количество единственного диастереомера) - (Количество других диастереомеров)/1.

Например, композиция, содержащая 90% от 1 и 10% от 2, 3, 4 или их смеси, имеет диастереомерный избыток 80% [(90-10)/1]. Композиция, содержащая 95% от 1 и 5% от 2, 3, 4 или их смеси, имеет диастереомерный избыток 90% [(95-5)/1]. Композиция, содержащая 99% от 1 и 1% от 2, 3, 4 или их смесь, имеет диастереомерный избыток 98% [(99-1)/1]. Диастереомерный избыток может так же быть рассчитан для любого из компонентов 1, 2, 3, или 4.

Термин "стереоизомерически чистый", как используется в настоящем документе, относится к соединению, где указанный стереоизомер присутствует в большей степени, чем другие стереоизомеры этого соединения, например, соединение присутствует в диастереомерном избытке. В некоторых вариантах стереоизомерически чистые композиции, описанные здесь, включают 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше или 97% или больше в развес одного стереоизомера соединения.

Конъюгаты в соответствии с различными вариантами, описанными в настоящем документе, могут быть подготовлены любым способом, известным из уровня техники. Иллюстративный протокол производства конъюгатов приведен в примерах ниже.

В одном варианте конъюгаты могут быть подготовлены i) путем реакции лиганда с молекулами лекарственного препарата с формулой (I) для формирования конъюгата с формулой (II), и ii) очищением конъюгата.

В альтернативном варианте конъюгат подготовлен путем реакции лиганда, линкера и биологически активного макролида в единственной реакции. После подготовки конъюгата в соответствии с изобретением они могут быть очищены.

В одном варианте композиции, включающие молекулы лекарственного препарата с формулой (I), и/или композиции, включающие конъюгированные соединения с формулой (II), описанные в настоящем документе, могут быть оценены на способность подавлять пролиферацию различных линий раковых клеток *in vitro*. Например, композиции, включающие молекулы лекарственного препарата с формулой (I), и/или композиции, включающие конъюгированные соединения с формулой (II), могут применяться *in vitro* к раковым клеткам в течение определенного количества дней и выжившие клетки, измеряются в количественном анализе известным способом.

Вышеупомянутая спецификация, примеры и данные предоставляют полное описание изготовления и использования композиции согласно изобретению. Начиная со многих вариантов изобретение может быть осуществлено, не отступая от духа и объема изобретения, как подробно изложено в прилагаемой формуле изобретения.

Все ссылки, процитированные в настоящем документе и в дальнейших примерах, включая патенты, изданные заявки на патент и литературные ссылки, явно включены полной ссылкой.

Описание и примеры, представленные ниже, предоставлены для иллюстрирования предмета изобретения. Для специалиста в отрасли очевидно, что эти примеры приведены только для иллюстрации и не включены в целях ограничения изобретения.

Варианты, раскрытые здесь, проиллюстрированы более подробно посредством неограничивающих примеров, приведенных ниже.

#### Краткое описание иллюстраций

Фиг. 1 иллюстрирует  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоксисукцинат (5).  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр соответствует единственному диастереомеру, присутствующему по крайней мере в 95% диастереомерном избытке, так как спектр не осложнен резонансами, относящимися к другому диастереомеру. (Для сравнения пример 2 дает  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр смеси диастереомеров).

Фиг. 2 иллюстрирует  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр смеси диастереомеров Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоксисукцинат (6).

Фиг. 3 иллюстрирует, что в клетках SKBR3 единственный конъюгат соединения диастереомеров HER2-5 (партии *in vitro* и *in vivo*) имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,3$  нМ по сравнению с 0,9 нМ для смеси конъюгата диастереомера HER2-6.

Фиг. 4 иллюстрирует, что в клетках BT474 единственный конъюгат соединения диастереомеров HER2-5 (*in vitro*) имеет значение  $\text{IC}_{50} = 4,6$  нМ, в то время как партия HER2-5 (*in vivo*) имела значение  $\text{IC}_{50} = 4,0$  нМ, по сравнению с 11,6 нМ для смеси конъюгата диастереомера HER2-6.

Фиг. 5 иллюстрирует, что в клетках NCI-N87 единственный конъюгат соединения диастереомеров HER2-5 (*in vitro*) имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,6$  нМ, в то время как партия HER2-5 (*in vivo*) имела значение  $\text{IC}_{50} = 0,4$  нМ по сравнению с 1,0 нМ для смеси конъюгата диастереомера HER2-6.

Фиг. 6 иллюстрирует, что в клетках HEK293/hEGFRvIII единственный конъюгат соединения диастереомеров EGFRvIII-5 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,4$  нМ, в то время как смесь конъюгата диастереомера EGFRvIII-6 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,5$  нМ.

Фиг. 7 иллюстрирует, что в клетках MMT/hEGFRvIII единственный конъюгат соединения диастереомеров EGFRvIII-5 имеет значением  $\text{IC}_{50} = 0,5$  нМ, в то время как смесь конъюгата диастереомера EGFRvIII-6 имеет значение  $\text{IC}_{50}$  почти в 20 раз выше = 9,8 нМ.

Фиг. 8 иллюстрирует, что в клетках U251/hEGFRvIII единственный конъюгат соединения диастереомеров EGFRvIII-5 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 2,4$  нМ, в то время как смесь конъюгата диастереомера EGFRvIII-6 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 3,3$  нМ.

Фиг. 9 иллюстрирует, что в клетках Ovsar-3 единственный конъюгат соединения диастереомеров MUC16-5 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 6,3$  нМ, в то время как смесь конъюгата диастереомера MUC16-6 имеет значение  $\text{IC}_{50} 16,0$  нМ.

Фиг. 10 иллюстрирует, что в клетках PC3/MUC16long единственный конъюгат соединения диастереомеров MUC16-5 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,34$  нМ, в то время как смесь конъюгата диастереомера MUC16-6 имеет значение  $\text{IC}_{50} = 0,80$  нМ.

Фиг. 11 иллюстрирует кривые роста опухоли у мышей после введения HER2-5 и реактивов контроля. Мыши получали лекарственную среду PBS (■), 300 мг/кг DM1-SMe (●) и изотип контроль mAb при 15 мг/кг (▼). Мыши также получили HER2 mAb (▲), HER2-5 (Δ) и изотип контроль 5 (∇) в дозе 1 мг/кг (A), 5 мг/кг (B) и 15 мг/кг (C). Мыши получали 3 однократные еженедельные дозы конъюгатов и агентов контроля, как обозначено черными стрелками (↑). Группы N = 8, среднее значение ± SE.

Фиг. 12 иллюстрирует изменение в объеме опухоли после введения HER2-5 и реактивов контроля после завершения дачи контрольной группе лекарственной среды PBS в день 79 после имплантации опухоли. Отдельные размеры опухоли показаны для каждой группы введения. Мыши получали лекарственную среду PBS (■), 300 мг/кг DM1-SMe (●) и изотип контроль mAb при 15 мг/кг (▼). Мыши также получили HER2mAb (▲), HER2-5(Δ) и изотип контроль-5 (∇) в дозе 1 мг/кг (A), 5 мг/кг (B) и 15 мг/кг (C). Группы N=8, среднее значение ± SE.

Фиг. 13 иллюстрирует процентное изменение веса животных после введения HER2-5 и реактивов контроля. Мыши получали лекарственную среду PBS (■), 300 мг/кг DM1-SMe (●) и изотип контроль mAb при 15 мг/кг (▼). Мыши также получили HER2 mAb (▲), HER2-5 (Δ) и изотип контроль 5 (∇) в дозе 1 мг/кг (A), 5 мг/кг (B) и 15 мг/кг (C). Мыши получали 3 однократные еженедельные дозы конъюгатов и агентов контроля, как обозначено черными стрелками (↑). Группы N=8, среднее значение ± SE.

#### Примеры

Экспериментальные данные.

Протон-спектры ЯМР (для соединений, которые не могли быть обнаружены УФ) были получены на аппарате Varian Inova 300 МГц, в то время как масс-спектры были получены на аппарате Agilent 1100, LC/MSD источником ионизации электроспрея и квадрупольной ионной ловушкой. Все конъюгаты были проанализированы с помощью масс-спектрометра Bruker ultraFleXtreme MALDI-TOF-TOF. Все исходные

материалы и растворители были приобретены коммерчески и использовались без очистки, если не указано иное.

Пример 1. Синтез малеимидилметил-4-транс-циклогексилкарбоксисукцинат (3).

Малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбоновая кислота (2): титульное соединение было подготовлено на двух этапах (этап А и этап В) с использованием модифицированных версий способов, описанных Marnett и др. (J. Med. Chem., 1996, 39, 1692-1670).

Этап А: раствор транс-4-аминометилциклогексанкарбоновой кислоты (7,00 г, 44,5 ммоль) в 1,4-диоксане (70 мл) обработали малеиновым ангидридом (4,89 г, 49,9 ммоль) и размешивали при температуре окружающей среды в течение 48 ч. Реакцию выпарили в вакууме до получения белой твердой фазы, которую можно было сохранить или использовать на следующем этапе без дальнейшей очистки.

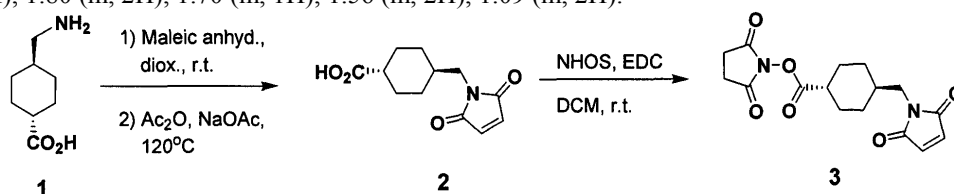
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.11 (m, 1H), 6.44 (d, 1H, J = 13 Гц), 6.24 (d, 1H, J = 13 Гц), 3.05 (t, 2H, J = 6 Гц), 2.13 (tt, 1H, J = 12 Гц, 4 Гц), 1.90 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.44 (m, 1H), 1.28 (m, 2H), 0.96 (m, 2H).

Этап В: малеиновая кислота с этапа А (36,8 г, 144 ммоль) и натрия ацетат (13,6 г, 165 ммоль) растворили в уксусном ангидриде (368 мл), изолировали в стеклянном сосуде с реагентом и нагревали до 120°C в течение 3 ч. Охлажденную реакционную смесь (черный сироп) вылили на воду (3 л), размешали и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали через воронку из пористого стекла и очищенный фильтрат выпаривали и высушивали под высоким вакуумом, получив титульное соединение в виде желтой твердой фазы (7,00 г, 20%).

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.73 (s, 2H), 3.40 (d, 2H, J = 7 Гц), 2.28 (m, 1H), 2.06 (m, 2H), 1.75 (m, 3H), 1.42 (m, 2H), 1.03 (m, 2H).

Малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбоксисукцинат (3): продукт предыдущего этапа В (10,0 г, 42,1 ммоль) растворили в дихлорметане (50 мл) в среде Ag, обработали N-гидросукцинимидом (7,27 г, 63,2 ммоль) и 1-(3-диметиламинпропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлоридом (EDAC, 12,4 г, 64,5 ммоль), реакцию быстро размешивали при температуре окружающей среды. Полученный коричневый раствор разбавили дихлорметаном, промыли водой и соевым раствором, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали через воронку из пористого стекла, а фильтрат сконцентрировали и высушили в вакууме. Этот продукт далее растворили в горячем этилацетате, обработали активированным древесным углем (1,5 г), отфильтровали и охладили фильтрат. Фильтрат кристаллического продукта промыли холодным этилацетатом и высушили в вакууме, получив титульное соединение в виде коричневой твердой фазы (5,52 г, 39%).

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.72 (s, 2H), 3.42 (m, 2H), 2.85 (br s, 4-й), 2.56 (tt, 1H, J = 12 Гц, 4 Гц), 2.18 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), 1.09 (m, 2H).



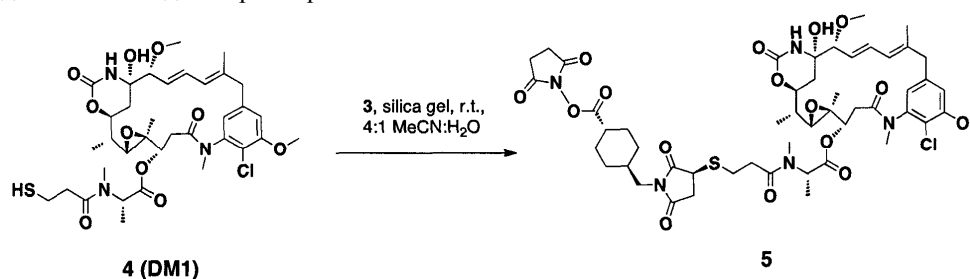
Пример 2. Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамида-3-тиол (4): титульное соединение, известное из уровня техники как DMI, подготовили с помощью модифицированной версии способа, описанного Whitesides и др. (J. Org. Chem., 1991, 56, 2648-2650). Майтанзин-3-N-метил-L-ала-(3-метилдисульфанил)пропанамида (DMI-SMe, 2,42 г, 3,09 ммоль, подготовленный способом, подобным Но и Carozzella, США, заявка на патент 2007/0037972 A1) растворили в ацетонитриле (30 мл), обработали раствором трис-(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (8,23 г, 28,7 ммоль) в воде (30 мл), pH фактор откорректировали приблизительно до 3 добавлением насыщенной водной  $\text{NaHCO}_3$  (5 мл), колбу очистили Ag и реакцию размешивали при температуре окружающей среды под резиновой септой (вентилируемой из-за пенообразования). После 2 ч реакцию обработали соевым раствором (приблизительно 100 мл), подвергли воздействию Ag в течение 5 мин (для удаления свободного метилмеркаптана) и выделили фазу. Водную фазу дважды экстрагировали этилацетатом (EtOAc), насытили NaCl и экстрагировали еще два раза EtOAc. Объединенные органические слои высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровали и фильтрат сконцентрировали и высушили в вакууме для получения титульного соединения в виде белой твердой фазы (2,24 г, 98%).

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6.76 (d, 1H, J=1,5 Гц), 6.63 (d, 1H, J = 11 Гц), 6.59 (d, 1H, J = 1,5 Гц), 6.35 (m, 2H), 5.59 (dd, 1H, J = 15 Гц, 9 Гц), 5.36 (q, 1H, J = 6,5 Гц), 4.68 (dd, 1H, J=12 Гц, 3 Гц), 4.21 (t, 1H, J=10 Гц), 3.92 (s, 3H), 3.60 (d, 1H, J = 13 Гц), 3.42 (d, 1H, J = 9 Гц), 3.29 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 3.05 (d, 1H, J=13 Гц), 2.95 (d, 1H, J = 10 Гц), 2.77 (s, 3H), 2.75-2.47 (m, 6H), 2.11 (dd, 1H, J= 14 Гц, 3 Гц), 1.58 (s, 3H), 1.47 (d, 1H, J=14 Гц), 1.40 (m, 1H), 1.22 (m, 6H), 0.73 (s, 3H). MS (ESI, pos): calc'd для  $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}$ , 737.3; найденный 738.3 (M+H), 720.3 (M-H $_2\text{O}$ +H).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамида-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоксисукцинат (5): следующая процедура описывает новый способ, не известный из уровня техники. Продукт предыдущего этапа (4, 2,23 г, 3,02 ммоль) и малеимидилметил-4-

циклогексанкарбоксисукцинат (3, 1,50 г, 4,49 ммоль) растворили в растворе 4:1 ацетонитрил/вода (75 мл), обработали гелем мелкодисперсного кремнезема, выскобленным с подготовительной пластины TLC (11,2 г), колбу очистили в среде Ag и смесь размешивали при температуре окружающей среды под резиновой септой. Спустя 18 ч еще 3 (0,77 г, 2,3 ммоль) и ацетонитрила (MeCN, 10 мл) было добавлено, реакцию размешивали еще 6 ч. Смесь отфильтровали над целитом, твердые фазы промыли MeCN и этилацетатом (EtOAc) и фильтрат сконцентрировали в вакууме до чистой твердой фазы, очистили колоночной хроматографией для отгона легких фракций на 120-граммовом кардридже из силикатного геля (50-100% 1:1 EtOAc/MeCN в дихлорметане более чем 33 мин, 75 мл/мин). Испарение и высушивание чистых фракций колонки в вакууме привели к получению титульного соединения в виде кремовой твердой фазы (2,09 г). Концентрация неочищенных фракций и повторная очистка на 80-граммовом картридже из силикатного геля, как описано выше, привели к получению дополнительной партии кремовой твердой фазы (0,22 г) и общая выработка соединения составила 2,31 г (71%).

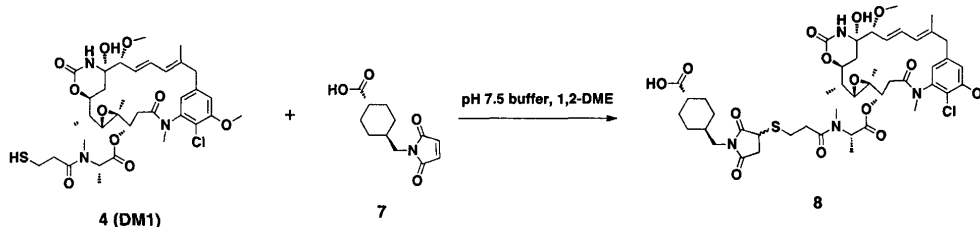
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.85 (d, 1H, J = 4 Гц), 6.72 (m, 1H), 6.65 (d, 1H, J = 4 Гц), 6.44 (dd, 1H, J = 15 Гц, 11 Гц), 6.25 (s, 1H), 5.67 (dd, 1H, J = 16 Гц, 9 Гц), 5.41 (m, 1H), 4.79 (d, 1H, J = 11 Гц), 4.30 (t, 1H, J = 11 Гц), 3.72 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, J = 9 Гц), 3.37 (m, 4H), 3.27 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.16-2.99 (m, 4H), 2.85 (m, 7H), 2.62 (m, 3H), 2.39 (ddd, 1H, J = 19 Гц, 12 Гц, 4 Гц), 2.18 (br m, 2H), 1.77 (br m, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60 - 1.47 (m, 4H), 1.31 (m, 6H), 1.05 (m, 2H), 0.82 (s, 3H). MS (ESI, pos): вычислено для  $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{ClN}_5\text{O}_{16}\text{S}$ , 1071.4; найдено 1072.4 (M+H), 1054.9 (M-H<sub>2</sub>O+H); 20589 нм = -52.4 (c = 0.00301, MeOH). См. фиг. 1 для  $^1\text{H}$ -ЯМР единственного диастереомера.



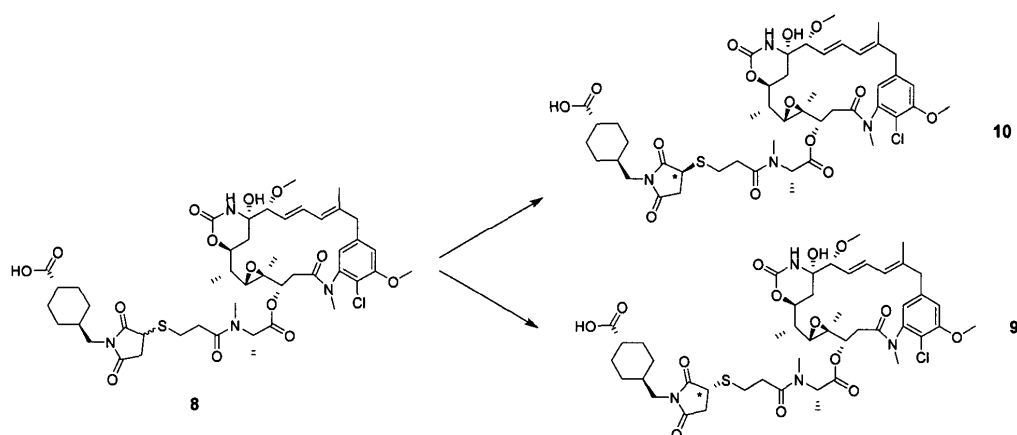
Пример 3. Смесь диастереомеров майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоксисукцинат (6): образец смешанных стереоизомеров 5 синтезировали согласно заявке на патент 20100129314 США, пример XI.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.85-6.6 (m), 6.4 (m), 6.1 (m), 5.8-5.4 (m), 5.2 (m), 4.92-4.79 (m), 4.4-4.1 (m), 4.03 (s), 3.82 (m), 3.8-2.2 (m), 2.1 (m), 2.07 (s), 2.0-0.8 (m). MS (ESI, pos): вычислено для  $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{ClN}_5\text{O}_{16}\text{S}$ , 1071.4; найдено 1072.4 (M+H). См. фиг. 2 для  $^1\text{H}$ -ЯМР смеси диастереомеров.

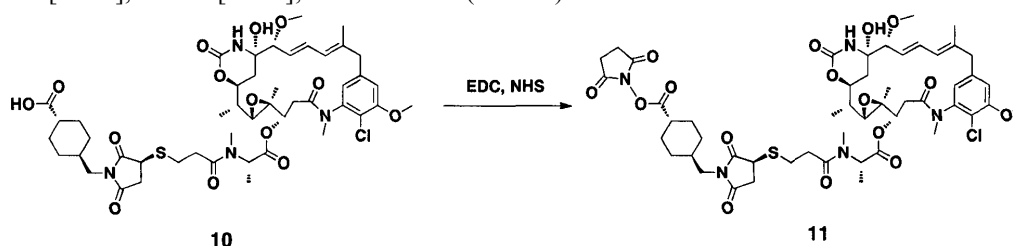
Пример 4. Рацемическая майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоновая кислота (8): раствор транс-1,4-(малеимидометил)циклогексан-1-карбоновой кислоты 7 (167 мг, 0,701 ммоль) в 1,2-диметоксиэтаноле (8 мл) добавили к раствору 4 (340 мг, 0,461 ммоль) в 1,2-диметоксиэтаноле (15 мл). Далее смесь обработали буфером с pH фактором 7,5 (20 мл) и добавили несколько капель насыщенной водной  $\text{NaHCO}_3$  для поддержания pH фактора. Реакционную смесь размешивали быстро при комнатной температуре под аргоном и затем сконцентрировали под сниженным давлением. Сырой остаток очистили хроматографией обращенной фазы с помощью колонки C18, колонки на 20-40 мкм (100 г), элюировав с градиентом (10 95% более 25 мин) ацетонитрила (AcOH 0,1%) в воде (AcOH 0,1%), и лиофилизировали для получения 8 (330 мг, 0,338 ммоль, 73%-я выработка) в виде белой твердой фазы. MS m/z: 977.2 [MH<sup>+</sup>], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; чистота: >98% (LC/MS).



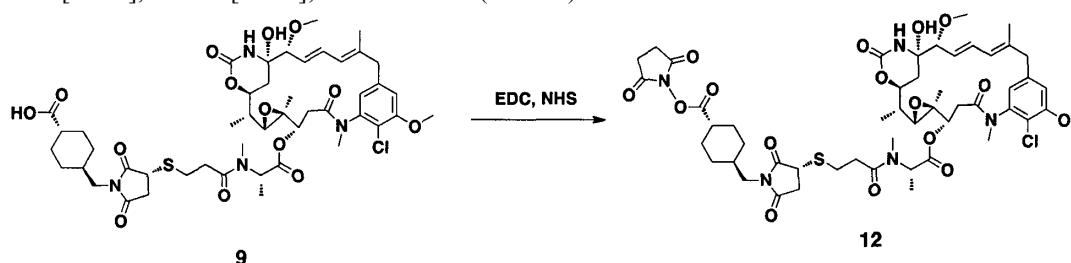
Пример 5. Хиральное разделение 8 к единственному диастереомеру ( $R^*$ )-майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоновая кислота (9) и ( $S^*$ )-майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоновая кислота (10) ( $S^*$  и  $R^*$  представляют единственный стереоизомер неизвестной хиральности): диастереомерную смесь соединений 8 (20 мг) растворили в 0,5 мл ацетонитрила и разделили с использованием полуподготовленной хиральной колонки (Chiralcel OJ, Система раствора, 6:1:1 гексаны: IPA:этанол) для получения 3,5 мг 10 в виде подвижного соединения, MS m/z: 977.2 [MH<sup>+</sup>], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; чистота: >95% (LC/MS), RT = 32 мин и 4,6 мг 9 в виде неподвижного соединения, MS m/z: 977.2 [MH<sup>+</sup>], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; чистота: >95% (LC/MS), Rf=48 мин.



Пример 6. Синтез (S\*)-майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоновой кислоты (11): раствор 10 (2,5 мг, 0,0026 ммоль) растворили в дихлорметане (1 мл), затем обработали N-гидросукцинимидом (NHS, 6,0 мг, 0,052 ммоль) и 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимид гидрохлоридом (EDCI, 13 мг, 0,065 ммоль). Реакционную смесь быстро размешивали при комнатной температуре в среде аргона, промыли водой с последующей промывкой солевым раствором, высушили над безводным сульфатом натрия и отфильтровали. Растворитель выпарили под сниженным давлением для получения сырого остатка, очищенного хроматографией обращенной фазы с помощью C18, колонка на 20-40 мкм (30 г), элюировав с градиентом (10-95% более чем 18 мин) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH) и лиофилизировали для получения 11. MS m/z: 1073.2 [MН<sup>+</sup>], 1054.4 [M-18]; чистота: 95% (LC/MS).



Пример 7. (R\*)-майтанзин-3-N-метил-L-аланин-пропанамидил-3-тио-3-сукцинимидил-N-метилциклогексил-4-транс-карбоновая кислота (12): раствор 9 (3, мг, 0,003 ммоль) растворили в дихлорметане (1 мл), затем обработали с N-гидросукцинимидом (NHS, 3,0 мг, 0,026 ммоль) и 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимид гидрохлоридом (EDCI, 7 мг, 0,036 ммоль). Реакционную смесь быстро размешивали при комнатной температуре в среде аргона, промыли водой с последующей промывкой солевым раствором, высушили над безводным сульфатом натрия и отфильтровали. Растворитель выпарили под сниженным давлением для получения сырого остатка, очищенного хроматографией обращенной фазы с помощью C18, колонка на 20-40 мкм (15 г), элюировав с градиентом (10-95% более чем 18 мин) ацетонитрила (AcOH 0,1%) в воде (AcOH 0,1%), лиофилизировали для получения 12. MS m/z: 1073.2 [MН<sup>+</sup>], 1054.4 [M-18]; чистота: 95% (LC/MS).



Пример 8. Подготовка и характеристика конъюгата.

Два различных состава мейтанзин-линкера, подготовленные согласно предыдущим примерам (соединения 5 и 6), конъюгировали с различными моноклональными антителами антигена антиопухоли. Соединение 5 включает преобладающе единственный диастереомер цитотоксического соединения линкера-DM1, тогда как соединение 6 включает смесь различных диастереомеров линкера-DM1. Антителами, используемыми в этом примере, были анти-HER2 антитело, получившее вариабельные области из humAb4D5-8 согласно Carter и др., PNAS 1992 89 4285, анти-EGFRvIII антитело, получившее вариабельные области от клона 131 согласно WO 2013075048 A1, и анти-MUC16 антитело, получившее вариабельности области от клона 3A5 согласно WO 2007001851.

Антитела были выражены в клетках CHO и очищены протеином А. Антитело контроля изотипа, не участвующее в связывании, полученное из антигена инфекционного заболевания, имеющего отношение к онкологии, также использовалось в этом примере.

Антитела (10 мг/мл) в 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH фактор 8.0 и 10% (v/v) DMA конъюгировали с 6-кратным избытком соединения 5 или 6 в течение 1 ч при температуре окружающей среды. Конъюгат очищали гель-фильтрационной хроматографией и стерильно отфильтровали. Полезные концентрации протеина и линкера определяли спектральным анализом УФ и масс-спектрометрией MALDI-TOF. Гель-фильтрационная ВЭЖХ показала, что все используемые конъюгаты были мономерными >95%, и RP-ВЭЖХ показала наличие <0,5% неконъюгированных полезным грузом линкеров. Результаты приведены в табл. 1 на основе протеина. Все конъюгированные антитела были проанализированы УФ для значений полезного груза линкера согласно Hamblett и др., Cancer Res 2004 10 7063 и разностью масс, начальной по сравнению с массой конъюгата. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Соединение	$\epsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ M}^{-1})$
5	26790	5700
6*	26790	5700

Антитело	$\epsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ M}^{-1})$
HER2	81847	215388
EGFRvIII	79579	209420
MUC16	88671	248380
Изотип контроль	81718	233480

Конъюгат антитела	Полезная нагрузка : Антитело (УФ)	Полезная нагрузка : Антитело (МС)	Выход %
HER2-5 ( <i>in vivo</i> )	2.7	2.7	66
HER2-5 ( <i>in vitro</i> )	3.1	2.4	75
HER2-6 ( <i>in vitro</i> )	2.9	2.4	70
EGFRvIII-5	2.8	2.3	56
EGFRvIII-6	2.9	2.2	56
MUC16-5	2.4	2.0	76
MUC16-6	2.3	2.1	96
Изотип контроль-5	3.3	3.3	67

\* Коэффициенты ослабления использовались из соединения 5.

Пример 9. Пробы цитотоксичности *in vitro*.

Клетки были засеяны в 96-луночный планшет, покрытый PDL по 10000 (SK-BR-3 и NCI-N87), 15000 (BT-474), 3000 (Ovcar-3 и PC3/Muc16), 2000 (HEK293/hEGFRvIII), 1500 (U251/hEGFRvIII) или 400 клеток (MMT/hEGFRvIII) на лунку в полной питательной среде, и быстро выращены. Для кривых жизнеспособности клетки конъюгаты антитела с лекарственным препаратом, последовательно разбавленные, или без полезной нагрузки, были добавлены к клеткам в заключительных концентрациях в пределах от 1 гм до 1 пм и выдерживались в течение 3 дней. Каждая концентрация была повторена дважды, принимая во внимание соответствующее среднее квадратичное отклонение. Клетки были засеяны ССК8 (Dojindo) в течение последних 1-3 ч, и спектральная поглощательная способность 450 нм ( $OD_{450}$ ) была определена на аппарате Flexstation3 (Molecular Devices). Фоновые уровни  $OD_{450}$  клеток, обработанных дигитонином (40 нм), были вычтены из всех клеток, и жизнеспособность была выражена как процент необработанных контрольных групп. Значения  $IC_{50}$  были определены из логистического уравнения с четырьмя параметрами.



рами с использованием динамической характеристики на 10 точек (GraphPad Prism). Все кривые и значения  $IC_{50}$  были скорректированы для эквивалентов полезного груза на основе данных эксперимента MALDI-TOF.

В клетках SKBR3 (линия рака молочной железы), изначально экспрессирующих HER2 в 607 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера HER2-5 (партии *in vitro* и *in vivo*) имел значение  $IC_{50}=0,3$  нМ, по сравнению с 0,9 нМ для смеси конъюгата соединения диастереомера HER2-6 (табл. 2, фиг. 3). Небольшая партия *in vitro* была конъюгирована первой и использовалась только для анализа пролиферации клеток, в то время как большая партия *in vivo* была конъюгирована позже и использовалась для экспериментов *in vitro* и для *in vivo*. Оголенное антитело HER2 имело мало свойств антипролиферации.

В клетках BT474 (линия рака молочной железы), изначально экспрессирующих HER2 в 426 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера (*in vitro*) имел значение  $IC_{50} = 4,6$  нМ, в то время как партия HER2-5 (*in vivo*) имела значение  $IC_{50}=4,0$  нМ, по сравнению с 11,6 нМ для смеси конъюгата соединения диастереомера HER2-6 (табл. 2, фиг. 4). Оголенное антитело HER2 имело мало свойств антипролиферации.

В клетках NCI-N87 (линия рака молочной железы), изначально экспрессирующих HER2 в 869 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера (*in vitro*) имел значение  $IC_{50} = 0,6$  нМ, в то время как партия HER2-5 (*in vivo*) имела значение  $IC_{50} = 0,4$  нМ, по сравнению с 1,0 нМ для смеси конъюгата соединения диастереомера HER2-6 (табл. 2, фиг. 5). Оголенное антитело HER2 имело мало свойств антипролиферации.

В клетках HEK293/hEGFRvIII, экспрессирующих hEGFRvIII в 360 раз выше связывающего изотипа контроля, оба конъюгата (единственный и смесь диастереомеров) имели значение  $IC_{50}=0,4$  нМ (табл. 3, фиг. 6). Оголенное антитело hEGFRvIII имело мало свойств антипролиферации.

В клетках MMT/hEGFRvIII, экспрессирующих hEGFRvIII в 280 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера EGFRvIII-5 имел значение  $IC_{50}=0,5$  нМ, в то время как смесь конъюгатов соединения диастереомера EGFRvIII-6 имела значение  $IC_{50} = 9,8$  нМ (табл. 2, фиг. 7). Оголенное антитело EGFRvIII имело мало свойств антипролиферации.

В клетках U251/hEGFRvIII, экспрессирующих hEGFRvIII в 165 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера EGFRvIII-5 имел значение  $IC_{50} = 2,4$  нМ, в то время как смесь конъюгатов соединения диастереомера EGFRvIII-6 имела значение  $IC_{50} = 3,3$  нМ (табл. 3, фиг. 7). Оголенное антитело EGFRvIII имело мало свойств антипролиферации.

В клетках Ovar3 (линия рака яичников), изначально экспрессирующих MUC16 в 373 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера MUC16-5 имел значение  $IC_{50} = 6,3$  нМ, в то время как смесь конъюгатов соединения диастереомера MUC16-6 имела значение  $IC_{50}=16,0$  нМ (табл. 4, фиг. 8). Оголенное антитело Muc16 имело мало свойств антипролиферации.

В клетках PC3/MUC16, экспрессирующих MUC16 в 105 раз выше связывающего изотипа контроля, единственный конъюгат соединения диастереомера MUC16-5 имел значение  $IC_{50} = 0,34$  нМ, в то время как смесь конъюгатов соединения диастереомера MUC16-6 имела значение  $IC_{50} = 0,8$  нМ (табл. 4, фиг. 9). Оголенное антитело Muc16 имело мало свойств антипролиферации.

На фиг. 3, 4, и 5 майтанзин-3-N-метил-L-ала-(3-метилдисульфанил)пропанамид (DM1-SMe, подготовленный согласно Но и Carozella, заявка на патент США 2007/0037972 A1) был выбран для придания полезного груза в этих исследованиях. Соединение 4 было бы слишком реактивными для использования *in vitro* или *in vivo*, таким образом, обеспечивая ненадежные результаты.

Результаты *in vitro* приведены в табл. 2-4 на основании целевого воздействия. Этот пример демонстрирует, что конъюгаты антитела с лекарственным препаратом против опухоли, включающий лекарственный препарат из одного диастереомера, описанного в настоящем изобретении, в большинстве случаев демонстрировал больший уровень потенции к уничтожению *in vitro*, чем соответствующие конъюгаты антитела с лекарственным препаратом, включающие смеси диастереомеров. Для проанализированных мишеней конъюгаты единственного диастереомера антитела с лекарственным препаратом, как правило, были на порядок в 2-3 раз мощнее, чем соответствующая смесь конъюгатов, в зависимости от определенных клеточных линий.

Таблица 2

Конъюгат антитела	SKBR <sub>3</sub> IC <sub>50</sub> (нМ)	BT474 IC <sub>50</sub> (нМ)	N87 IC <sub>50</sub> (нМ)
HER2-5 ( <i>in vivo</i> )	0.3	4.0	0.4
HER2-5 ( <i>in vitro</i> )	0.3	4.6	0.6
HER2-6 ( <i>in vitro</i> )	0.9	11.6	1.0

Таблица 3

Конъюгат антитела	HEK293/hEGFRvIII IC50 (нМ)	MMT/hEGFRvIII IC50 (нМ)	U251/hEGFRvIII IC50 (нМ)
EGFRvIII-5	0.4	0.5	2.4
EGFRvIII-6	0.5	9.8	3.3

Таблица 4

Конъюгат антитела	Ovcar-3 IC50 (нМ)	PC3/MUC16 IC50 (нМ)
MUC16-5	6.3	0.34
MUC16-6	16.0	0.80

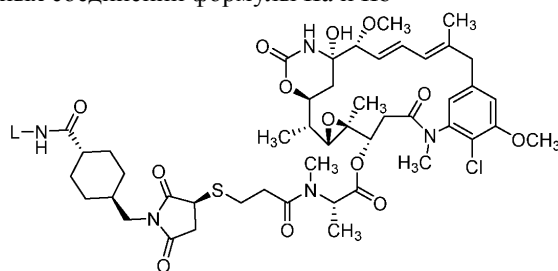
Пример 10. Исследования *in vivo*.

Чтобы определить *in vivo* эффективность конъюгата анти-HER2 единственного диастереомера (HER2-5), исследования были проведены на мышах, которым вживили ксенотрансплантаты рака желудка HER2+, поскольку об эффективности в этой модели ранее сообщал Barok и др. (Barok M. и др., *Can Letters* 2011). В частности,  $5 \times 10^6$  клеток NCI-N87 (ATCC CRL-5822) были внедрены подкожно в нижний правый фланг мышей CB-17 SCID (Taconic). Как только опухоли достигли среднего объема 150 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали по группам из восьми особей, которым вводили реактивы контроля или HER2-5. Реактивы контроля включали лекарственную среду PBS, без DM1-SMe, изотип контроль, изотип контроль-5 или HER2. Мыши получали еженедельные дозы один раз в течение трех недель, и объемы опухоли и масса тела проверялись дважды в неделю в течение всего исследования. Конъюгаты вводили в дозах 1, 5 и 15 мг/кг, поскольку эти дозы, как оказалось, были эффективными в предыдущем эксперименте *in vivo* Lewis-Phillips и др. (Lewis-PhillipsG и др., *Can Res* 2008).

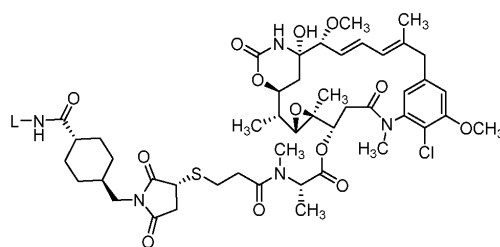
В текущей модели опухоли N87, HER2-5 продемонстрировали четкую эффективность против опухоли, при этом дозы 5 и 15 мг/кг привели к значительным уменьшениям в начальном объеме опухоли и уничтожениям некоторых опухолей при более высокой дозе (фиг. 11 и 12). Значительная задержка роста опухоли относительно агентов контроля также наблюдалась на уровне дозы 1 мг/кг. Нежелательные явления не наблюдались после введения мышам HER2-5, демонстрируя стабильный привес в течение всего исследования (фиг. 13).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Смесь диастереомерных соединений формулы Ia и Ib



Ia



Ib

где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом; и

где соединение формулы Ia или Ib представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в

формуле IIa или IIb.

2. Смесь по п.1, где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, которые связывают опухоль-ассоциированный антиген, выбранный из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

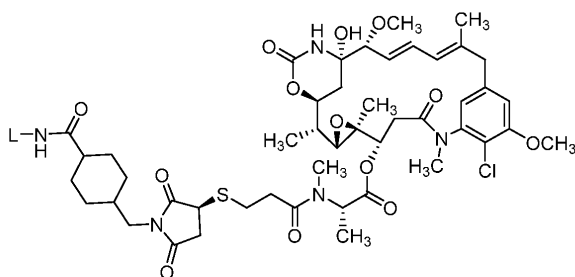
3. Смесь по п.2, где опухоль-ассоциированный антиген выбирается из группы, содержащей EGFRvIII, Her2 и Muc16.

4. Смесь по п.3, где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

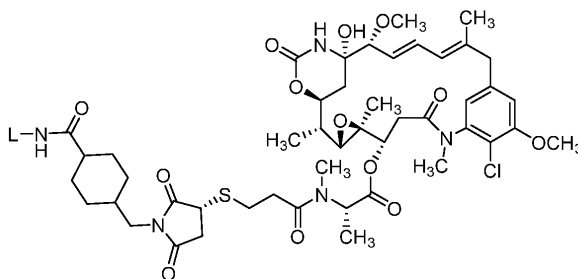
5. Смесь по любому из пп.1-4, где соединение формулы IIa представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%.

6. Смесь по п.1, где соединение с формулой IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%.

7. Антипролиферативная фармацевтическая композиция, содержащая смесь диастереомерных соединений формулы IIa или IIb



IIa

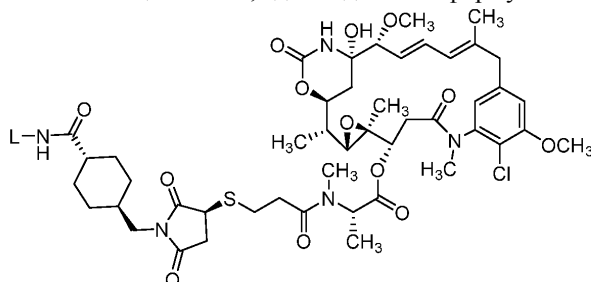


IIb

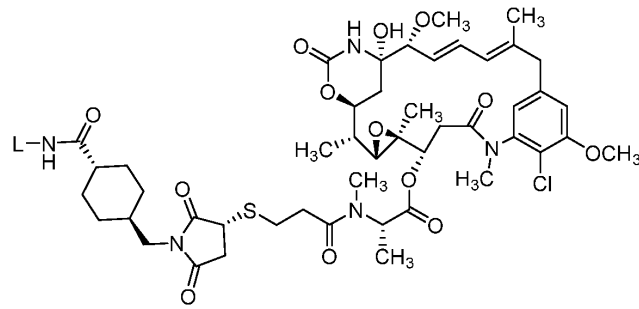
и фармацевтически приемлемый наполнитель,

где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом и соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где соединение формулы IIa или IIb представляет собой

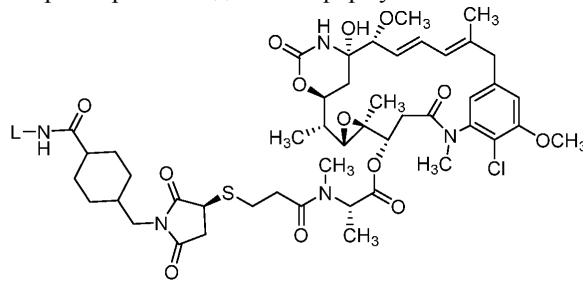


или

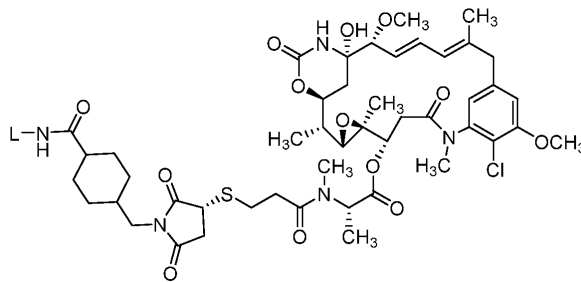


9. Фармацевтическая композиция по п.8, где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

10. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с опухоль-ассоциированным антигеном, который выбирается из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA FOLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3; где способ заключается в введении терапевтически эффективного количества смеси диастереомерных соединений формулы IIa или IIb



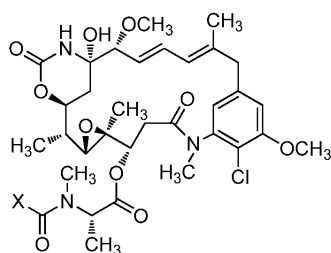
IIa



IIb

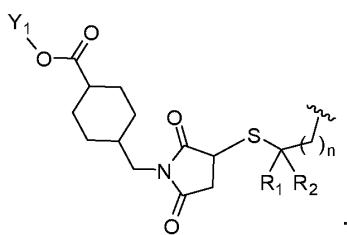
где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, которые связывают указанный опухоль-ассоциированный антиген, и где соединение представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

11. Смесь диастереомеров соединения формулы I

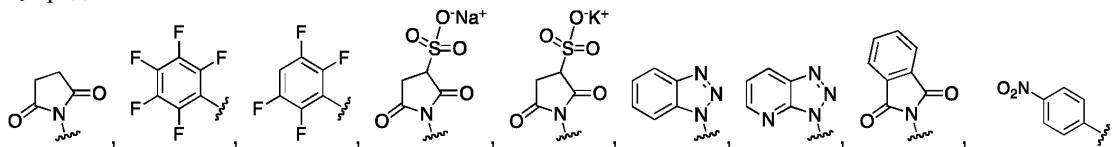


I

где X представляет собой



Y<sub>1</sub> представляет собой



или H;

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбираются из H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила и

n равен 1;

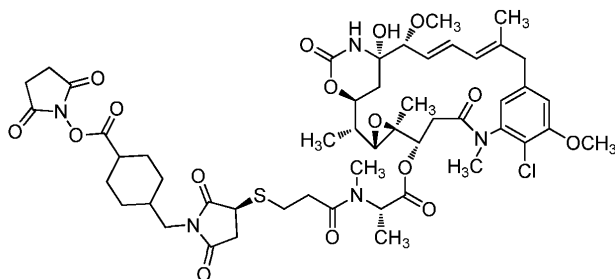
где соединение формулы I представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

12. Смесь по п.11, где Y<sub>1</sub> представляет собой

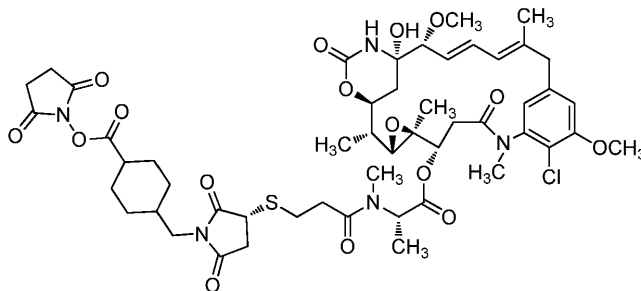


13. Смесь по п.11, где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой H.

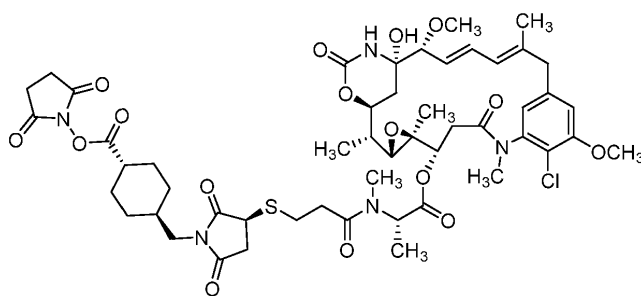
14. Смесь по п.11, где соединение формулы I представляет собой



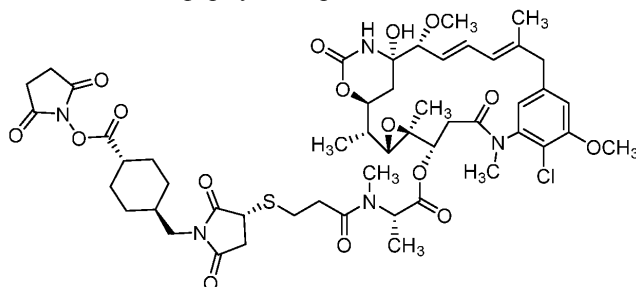
или



15. Смесь по п.14, где соединение формулы I представляет собой

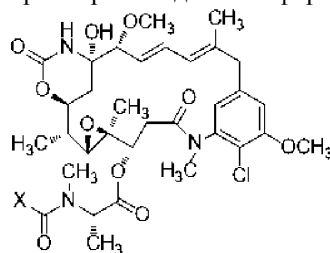


16. Смесь по п.14, где соединение формулы I представляет собой



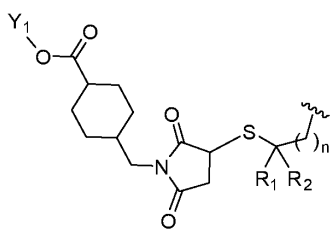
17. Смесь по любому из пп.11-16, где диастереомерный избыток превышает 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

18. Способ получения смеси диастереомеров соединения формулы I

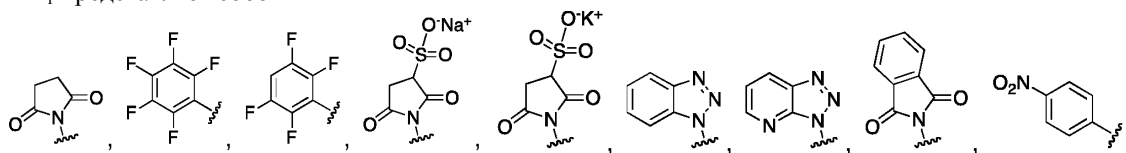


I

где X представляет собой



Y<sub>1</sub> представляет собой



или H;

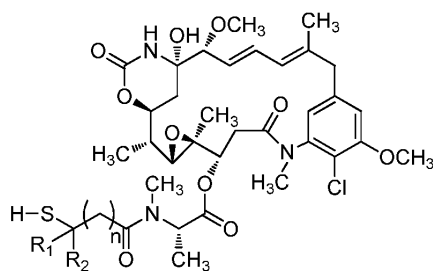
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбираются из H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила и

n равен 1;

включающий в себя этапы:

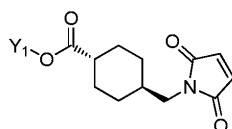
(a) обеспечение взаимодействия

(i) соединения формулы III



III;

(ii) соединения формулы IV



IV

(iii) силикагеля и

(iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду; и

(b) выделение соединения формулы I, представленного в диастереомерном избытке, превышающем 50%, где диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

19. Способ по п.18, где органический растворитель содержит полярный апротонный растворитель.

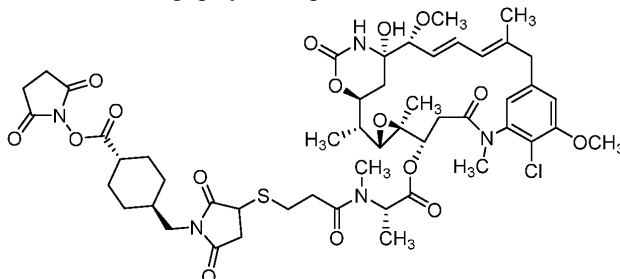
20. Способ по п.19, где полярный апротонный растворитель содержит ацетонитрил.

21. Способ по п.20, где органический растворитель и вода присутствуют в объемной пропорции от 1:1 до 4:1 или от 1:1 до 10:1.

22. Способ по п.18, где молярная пропорция соединения с формулой III и соединения с формулой IV составляет от 1:1 до 1:3.

23. Способ по п.18, где n равен 1 и R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, каждый независимо, представляют собой водород.

24. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



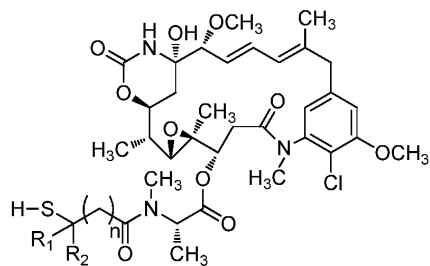
25. Способ по п.18, включающий на этапе (a) обеспечение взаимодействия в атмосфере аргона.

26. Способ по п.18, включающий на этапе (a) перемешивание соединения формулы III, соединения формулы IV; силикагеля, растворителя, включающего органический растворитель, и воды.

27. Способ по любому из пп.19-26, где после этапа (a) и перед этапом (b) производится

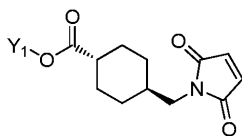
(c) добавление

(i) соединения формулы III



III;

(ii) соединения формулы IV



IV

- (iii) силикагеля и  
 (iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду;  
 (d) обеспечение взаимодействия соединения формулы III, соединения формулы IV, силикагеля и растворителя, включающего органический растворитель и воду; при этом  $R_1$  и  $R_2$  независимо выбраны из H или  $C_1$ - $C_{10}$ -алкила; и n равен 1.

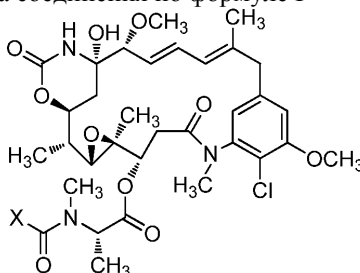
28. Способ по п.18, включающий в себя на этапе (c) выделение соединения с формулой I путем фильтрации.

29. Способ по п.28, где фильтрация производится посредством целита.

30. Способ по п.18, дополнительно включающий в себя очистку соединения с формулой I посредством колоночной хроматографии на силикагеле.

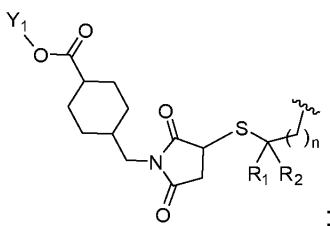
31. Способ по п.30, дополнительно включающий в себя высушивание соединения с формулой I.

32. Способ получения конъюгата соединения по формуле I

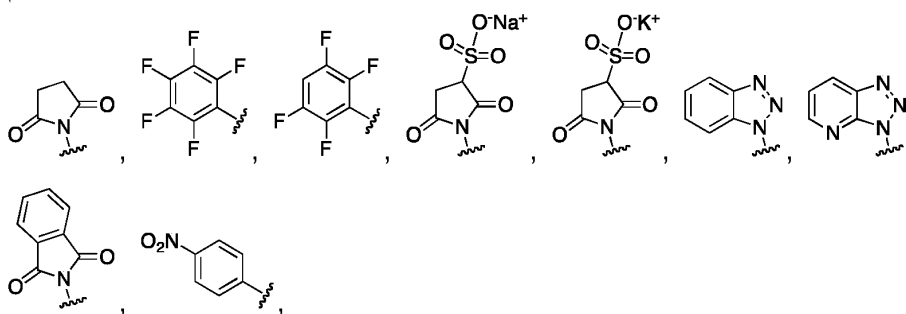


I,

где X представляет собой



$Y_1$  представляет собой



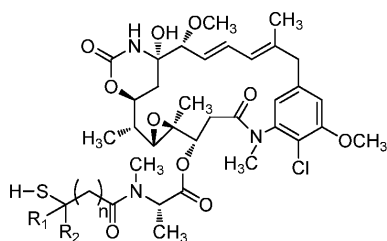
или H;

$R_1$  и  $R_2$  независимо выбираются из H или  $C_1$ - $C_{10}$ -алкила и n равен 1;

с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, включающий следующие этапы:

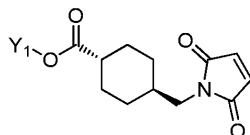
- (a) взаимодействие  
 (i) соединения формулы III





III

(ii) соединения формулы IV



IV

(iii) силикагеля и

(iv) растворителя, включающего органический растворитель и воду;

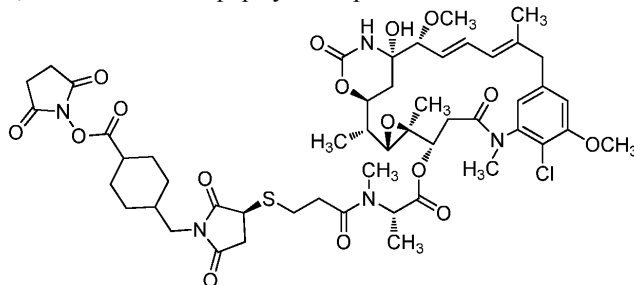
(b) обеспечение реакции между соединением формулы III с соединением формулы IV;

(c) выделение соединения формулы I, представленного в диастереомерном избытке, превышающем 50%, где диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I; и

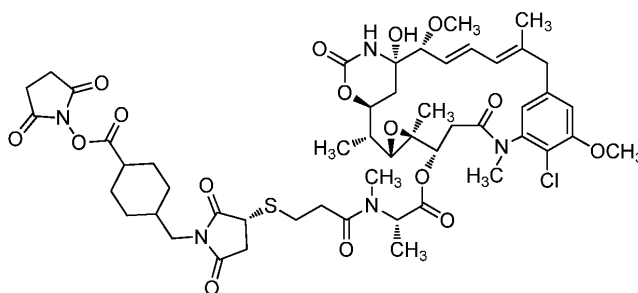
(d) сочетание соединения формулы I и антитела или его антиген-связывающего фрагмента для создания антительного лекарственного конъюгата.

33. Способ по п.32, где соединение формулы I прикреплено к антителу или антиген-связывающему фрагменту посредством S, O или NR<sub>3</sub>, при этом R<sub>3</sub> является H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилом.

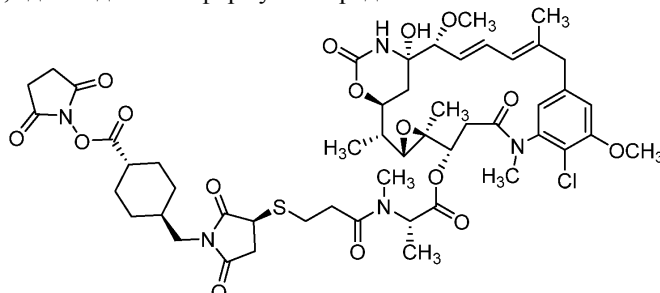
34. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



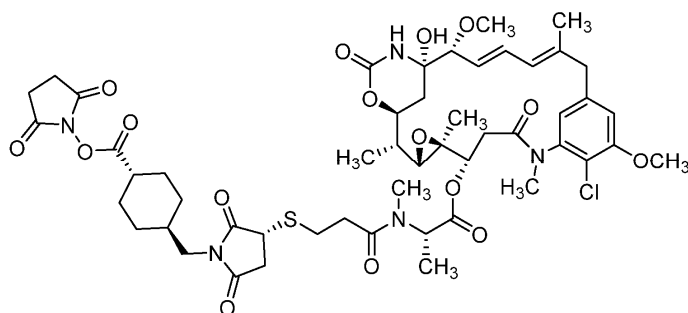
или



35. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



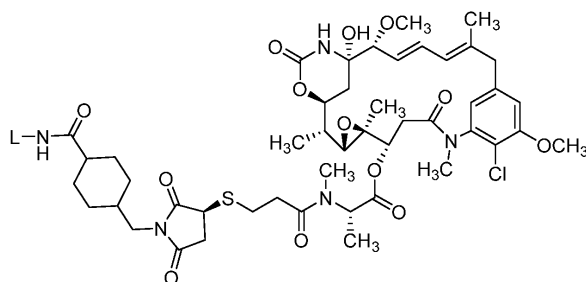
36. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



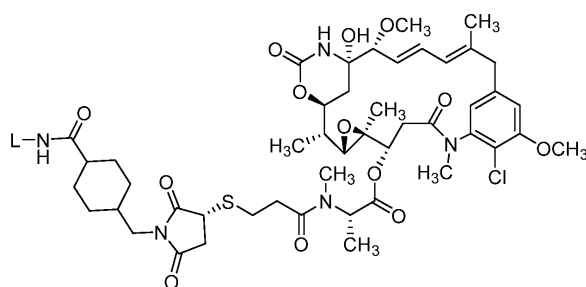
37. Способ по п.32 или 33, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывают опухоль-ассоциированный антиген, который выбирается из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

38. Способ по п.36, где опухоль-ассоциированный антиген выбирается из группы, содержащей EGFRvIII, Her2 и Muc16.

39. Способ получения смеси диастереомерных соединений формулы IIa и IIb



IIa

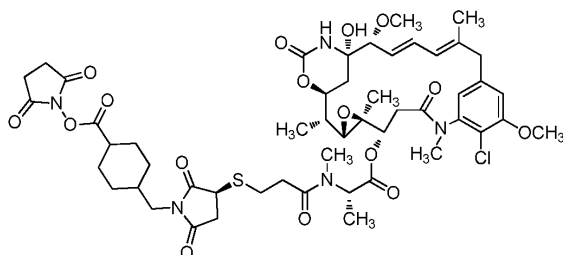


IIb

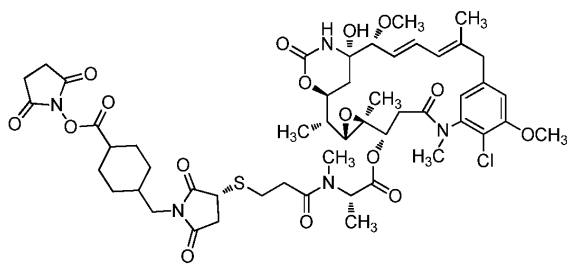
где L является антителом или его антиген-связывающим фрагментом; и

где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на смеси, содержащей по меньшей мере два диастереомера, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb, включающий:

(а) реакцию антитела или его антиген-связывающего фрагмента L с соединением формулы I, где соединение представляет собой



или



где соединение формулы I представлено в диастереомерном избытке, превышающем 50%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I; и

(b) очищение соединения формулы IIa или IIb.

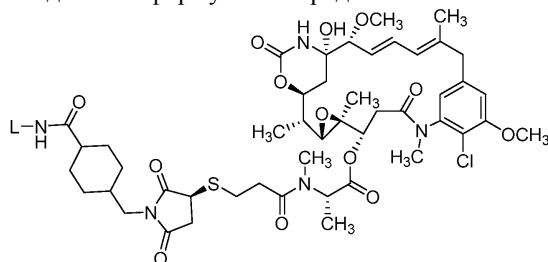
40. Способ по п.39, где L представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывает опухоль-ассоциированный антиген, который выбирается из группы, содержащей AFP, ALK, BAGE белки,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 или CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , Tmprss2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

41. Способ по п.40, где опухоль-ассоциированный антиген выбирается из группы, содержащей EGFRvIII, Her2 и Muc16.

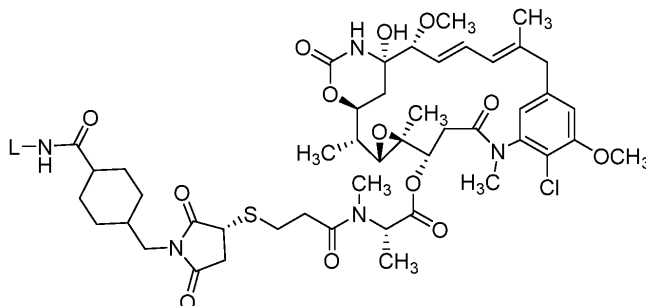
42. Способ по п.39, где соединение формулы IIa или IIb представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле IIa или IIb.

43. Способ по п.39, где соединение формулы I представлено в диастереомерном избытке, превышающем 95%, при этом диастереомерный избыток основан на количествах по меньшей мере двух диастереомеров, имеющих разные стереохимические конфигурации хирального углерода, который связан с атомом серы в формуле I.

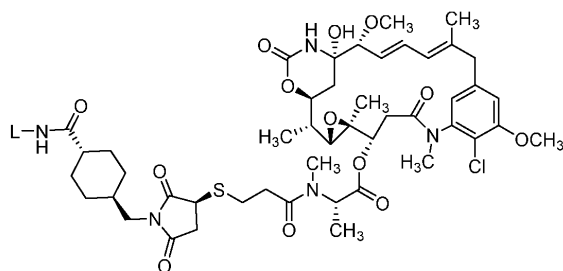
44. Способ по п.39, где соединение формулы IIa представляет собой



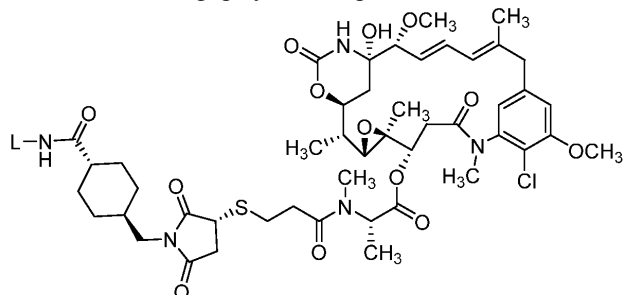
45. Способ по п.39, где соединение формулы IIb представляет собой



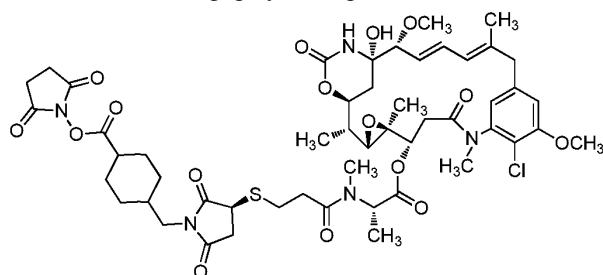
46. Способ по п.39, где соединение формулы IIa представляет собой



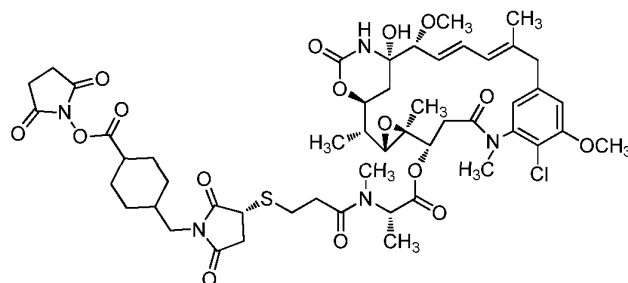
47. Способ по п.39, где соединение формулы IIb представляет собой



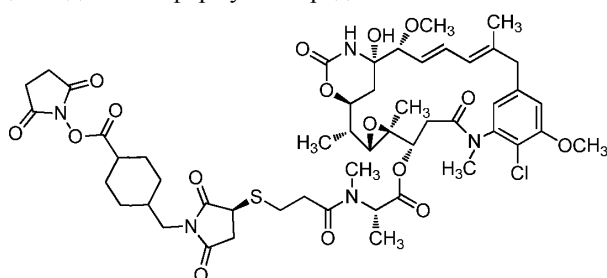
48. Способ по п.39, где соединение формулы I представляет собой



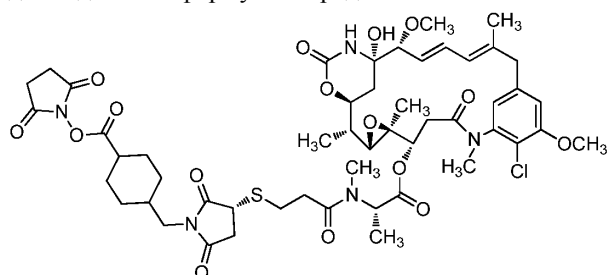
или



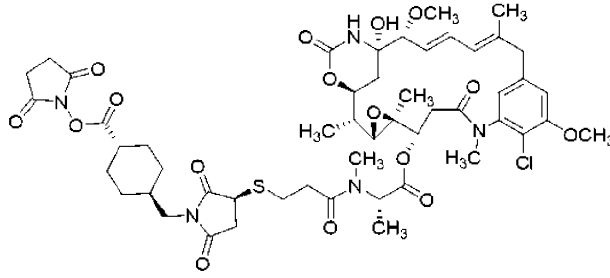
49. Способ по п.39, где соединение формулы I представляет собой



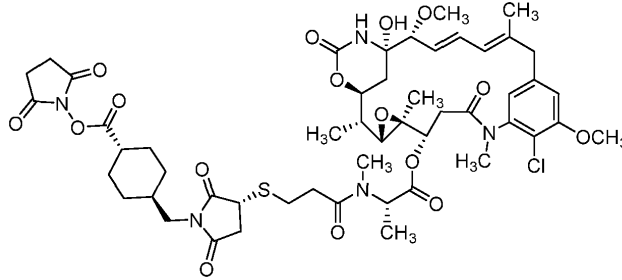
50. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



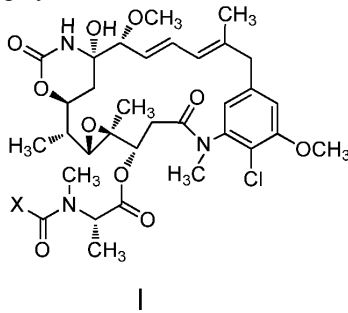
51. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



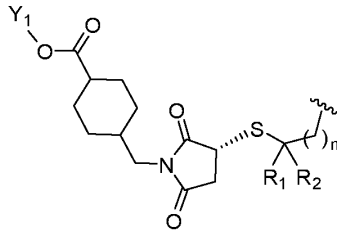
52. Способ по п.18, где соединение формулы I представляет собой



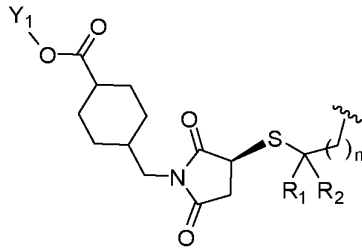
53. Диастереомер соединения формулы I



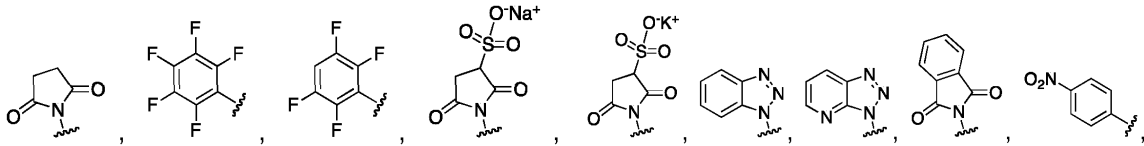
где X представляет собой



или



$Y_1$  представляет собой



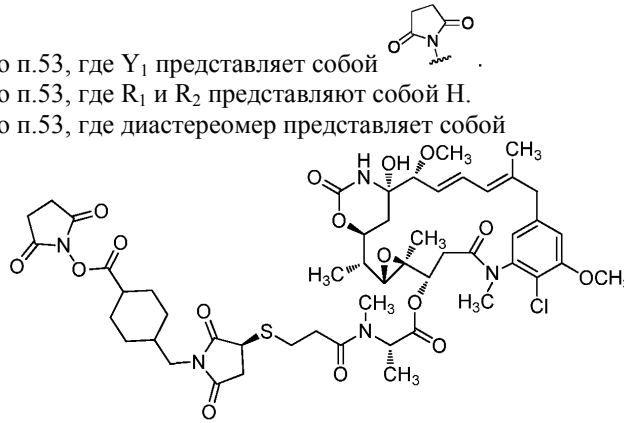
или H;

$R_1$  и  $R_2$  независимо выбираются из H или  $C_1$ - $C_{10}$ -алкила и  $n$  равняется 1.

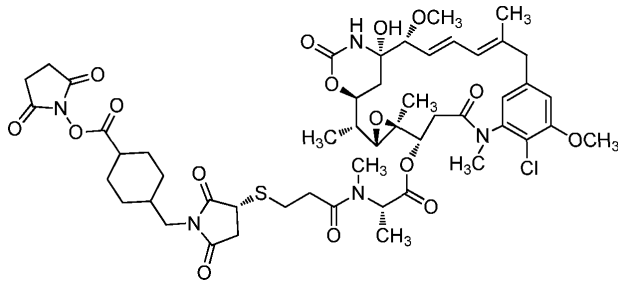
54. Диастереомер по п.53, где  $Y_1$  представляет собой

55. Диастереомер по п.53, где  $R_1$  и  $R_2$  представляют собой H.

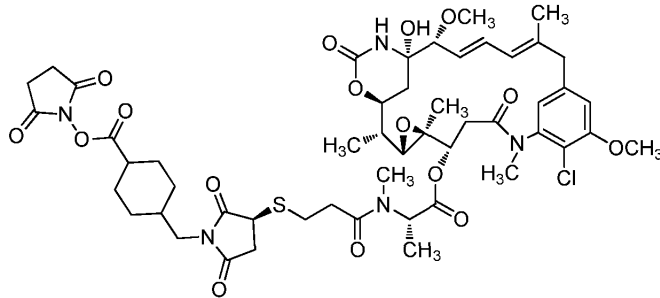
56. Диастереомер по п.53, где диастереомер представляет собой



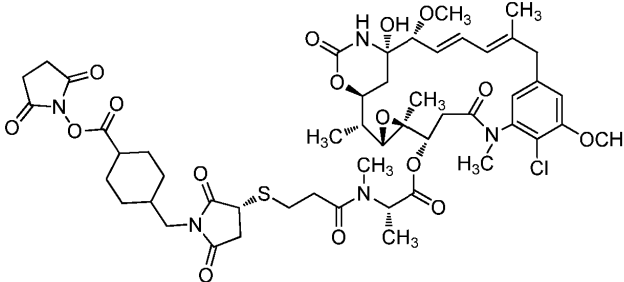
или



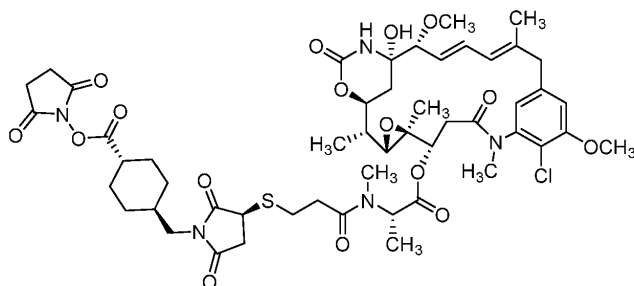
57. Диастереомер по п.53, где диастереомер представляет собой



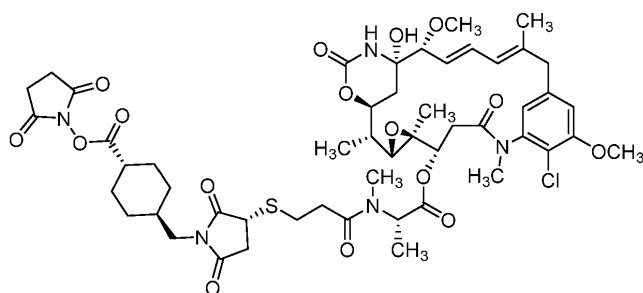
58. Диастереомер по п.53, где диастереомер представляет собой



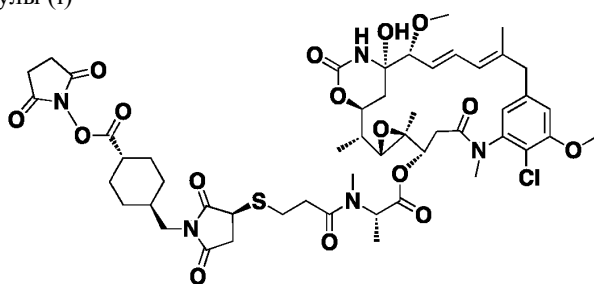
59. Диастереомер по п.53, где диастереомер представляет собой



60. Диастереомер по п.53, где диастереомер представляет собой



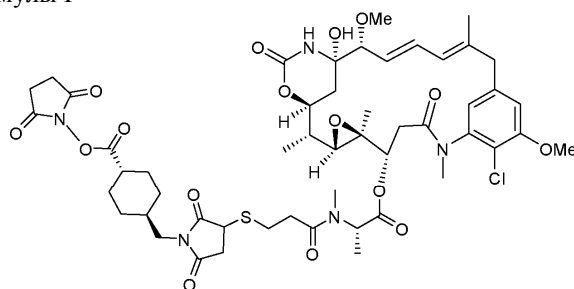
61. Диастереомер по п.53, характеризующийся  $^1\text{H}$  ЯМР спектром, указанным на фиг. 1.  
62. Соединение формулы (i)



(i)

где соединение является стереомерно чистым.

63. Смесь по п.2, в которой белки GAGE выбирают из группы, состоящей из белков GAGE-1 и GAGE-2.  
64. Смесь по п.2, в которой белки MAGE выбирают из группы, состоящей из белков MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6 и MAGE-12.  
65. Способ по п.10, где белки GAGE выбирают из группы, состоящей из белков GAGE-1 и GAGE-2.  
66. Способ по п.10, где белки MAGE выбирают из группы, состоящей из белков MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6 и MAGE-12.  
67. Способ по п.37, где белки GAGE выбирают из группы, состоящей из белков GAGE-1 и GAGE-2.  
68. Способ по п.37, где белки MAGE выбирают из группы, состоящей из белков MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6 и MAGE-12.  
69. Способ по п.40, где белки GAGE выбирают из группы, состоящей из белков GAGE-1 и GAGE-2.  
70. Способ по п.40, где белки MAGE выбирают из группы, состоящей из белков MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6 и MAGE-12.  
71. Способ по любому из пп.18-27, где на этапе (а) приведение в контакт длится в течение 18 ч.  
72. Способ по любому из пп.18-27, где соединение формулы IV находится в избытке против стехиометрии соединения формулы III.  
73. Способ по любому из пп.18-27, который также включает приведение в контакт с дополнительным количеством соединения формулы IV после этапа (а).  
74. Способ по любому из пп.18-27, где молярное отношение соединения формулы IV к соединению формулы III составляет 2,3:1 на этапе (а).  
75. Способ по п.18, в котором молярное отношение соединения формулы IV к соединению формулы III составляет 1,5:1 на этапе (а).  
76. Композиция для лечения пролиферативных расстройств, содержащая конъюгат антитела после реакции с соединением формулы I



(I)

характеризуемый  $^1\text{H}$  ЯМР спектром, указанным на фиг. 1, и фармацевтически приемлемый носитель.

77. Смесь диастереомеров, полученных способом по п.18.

78. Смесь диастереомеров, полученных способом по п.18, где R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> пред-

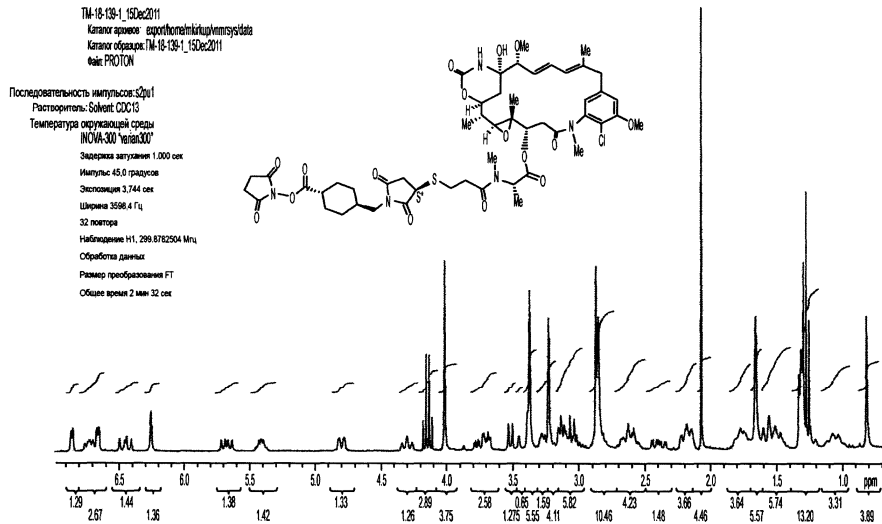
ставляет собой H и Y<sub>1</sub> представляет собой



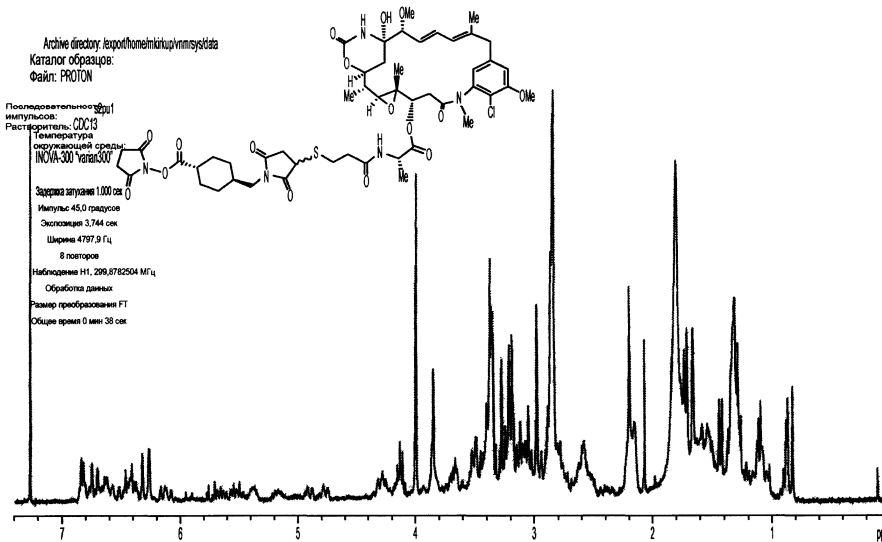
79. Конъюгат, полученный способом по п.32.

80. Конъюгат, полученный способом по п.32, где R<sub>1</sub> представляет собой H, R<sub>2</sub> представляет собой H

и Y<sub>1</sub> представляет собой



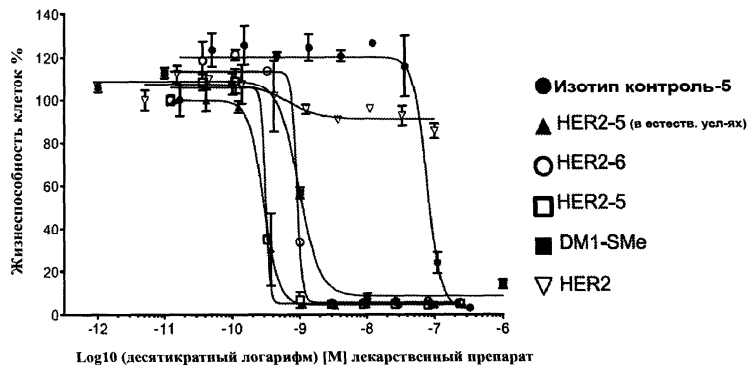
Фиг. 1



Фиг. 2

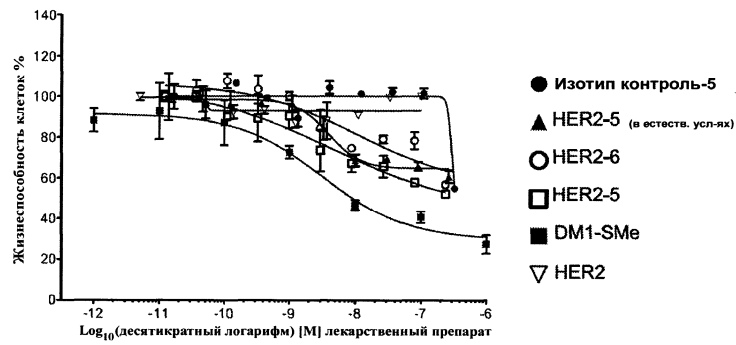


## SKBR3



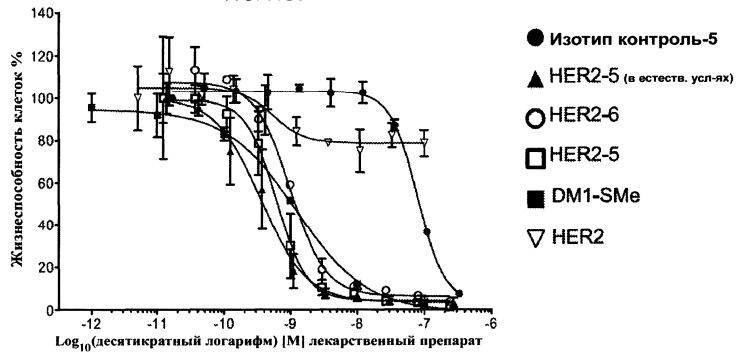
Фиг. 3

## BT474

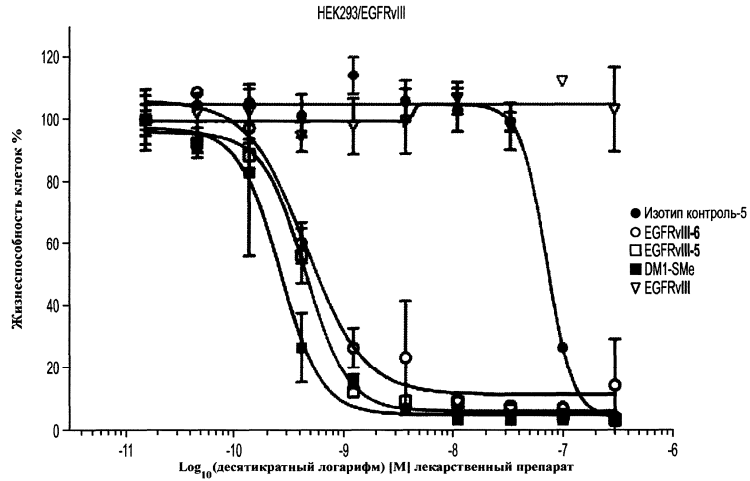


Фиг. 4

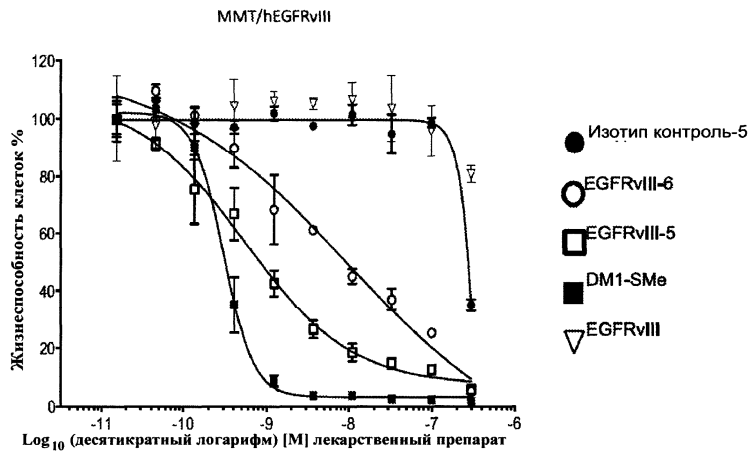
## NCI N87



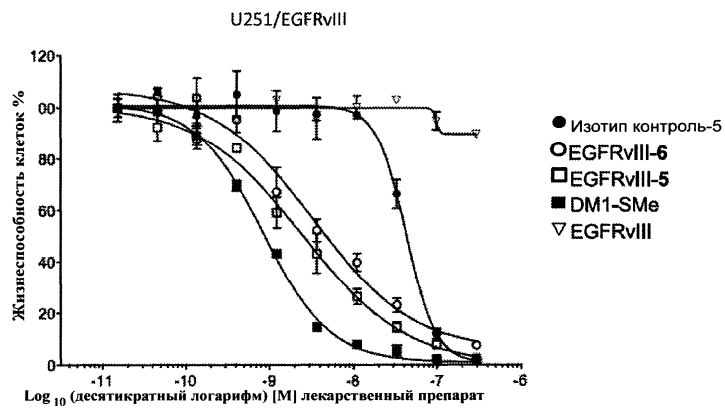
Фиг. 5



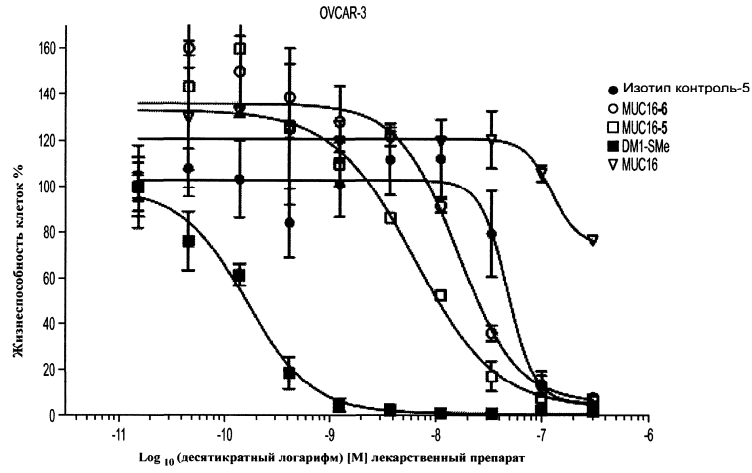
Фиг. 6



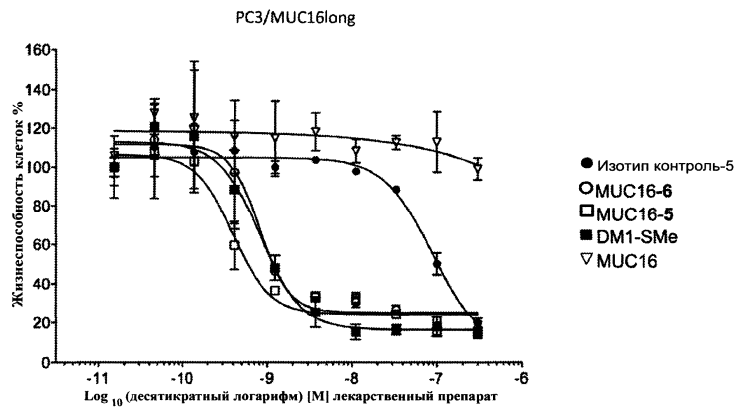
Фиг. 7



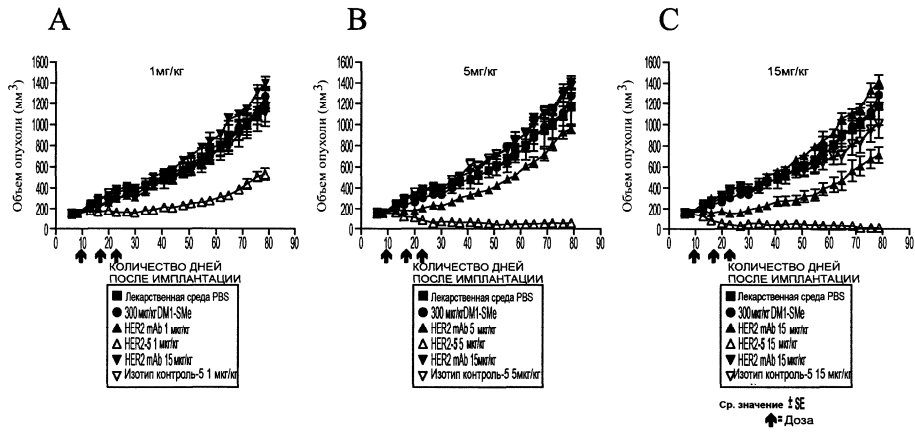
Фиг. 8



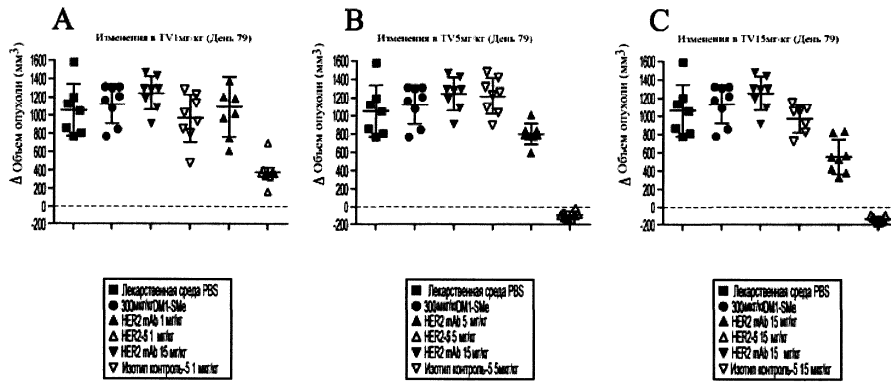
Фиг. 9



Фиг. 10

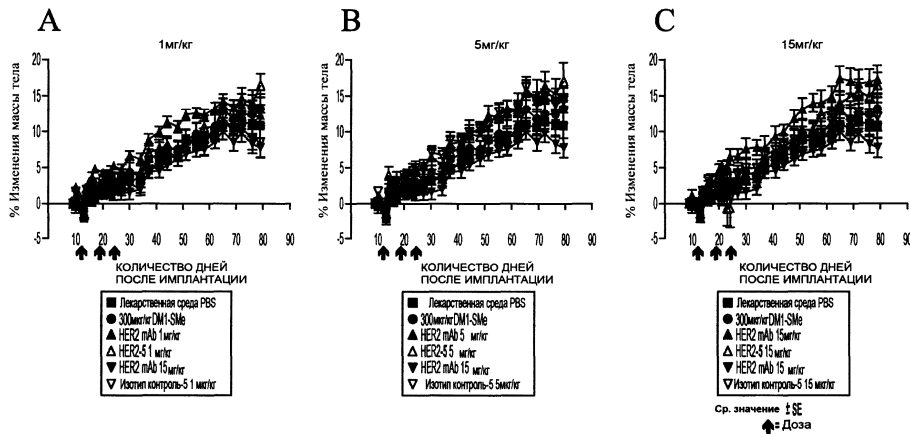


Фиг. 11



Ср. значение ± SD

Фиг. 12



Ср. значение ± SE  
▲ Доза

Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2