

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047476

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.25

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202292092

(22) Дата подачи заявки
2021.01.21

(54) СОЕДИНЕНИЯ И КОНЬЮГАТЫ НА ИХ ОСНОВЕ

(31) 62/964,180; 63/085,414

(32) 2020.01.22; 2020.09.30

(33) US

(43) 2022.11.02

(86) PCT/EP2021/051263

(87) WO 2021/148501 2021.07.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Ю Фэй (US), Дикинсон Найэлл,
Говард Филип Уилсон (GB)

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

(56) NAKADA TAKASHI ET AL.: "Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads", *BIORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 26, no. 6, 8 February 2016 (2016-02-08), pages 1542-1545, XP029436554, ISSN: 0960-894X, DOI:10.1016/J.BMCL.2016.02.020; Abstract, scheme 1

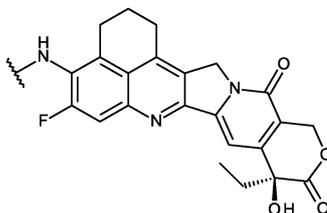
SUGIMORI M. ET AL.: "Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified Hexacyclic Camptothecin Analogues", *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 41, no. 13, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2308-2318, XP002239569, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM970765Q, table 1, compound 34 at page 2309, page 2311, left column, first paragraph

WO-A1-2020200880

EP-A1-0495432

EP-A2-0296597

(57) Конъюгат, содержащий следующее производное ингибитора топоизомеразы (A*):



A*

с линкером для присоединения звена, представляющего собой лиганд, где линкер присоединен посредством расщепляемой связи к аминокислотному остатку. Звено, представляющее собой лиганд, предпочтительно представляет собой антитело. Также предусмотрены A* с присоединенным связывающим звеном и промежуточные соединения для их синтеза, а также высвобождаемый поражающий элемент.

B1

047476

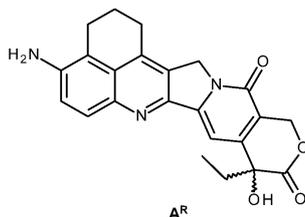
047476 B1

Настоящее изобретение относится к нацеливающимся конъюгатам, содержащим специфический ингибитор топоизомеразы, и соединениям, применимым в их синтезе, а также к высвобождаемому поражающему элементу.

Предпосылки изобретения Ингибиторы топоизомеразы

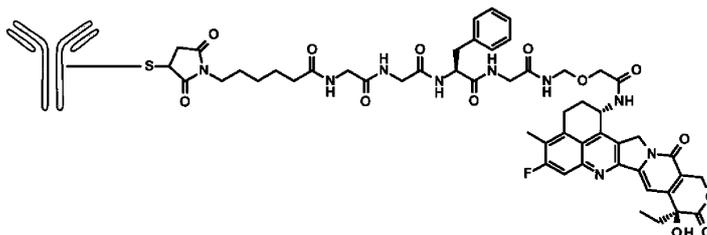
Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химические соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомеразы I и II), которая представляет собой тип фермента, который контролирует изменения в структуре ДНК посредством катализа разрыва и восстановления фосфодиэфирного остова нитей ДНК в ходе нормального клеточного цикла.

Следующее соединение:

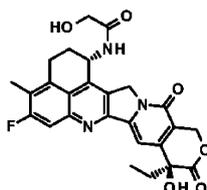


в рацемической форме было раскрыто в EP 0296597 (пример 63). Оно также раскрыто (как соединение 34 в рацемической форме) в Sugimori M., et al., JMed Chem, 1998, 41, 2308-2318 (DOI: 10.1021/jm970765q), где его биологическая активность рассматривается наряду с биологической активностью ряда родственных соединений.

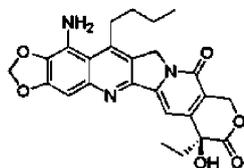
Различные ингибиторы топоизомеразы, такие как производные иринотекана и эксатекана и доксорубицин, были включены в состав конъюгатов антитело-лекарственное средство. Например, на стадии клинических испытаний находится DS-8201a компании Daiichi Sankyo



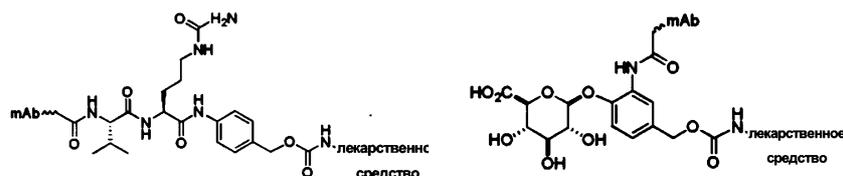
где антитело представляет собой Her2 (Takegawa, N., et al., Int J Cancer, 2017, 141, 1682-1689 (DOI: 10.1002/ijc.30870)). Данный ADC высвобождает производное эксатекана:



В Burke, P.J. et al., Bioconjugate Chem., 2009, 20, 1242-1250 раскрыты конъюгаты

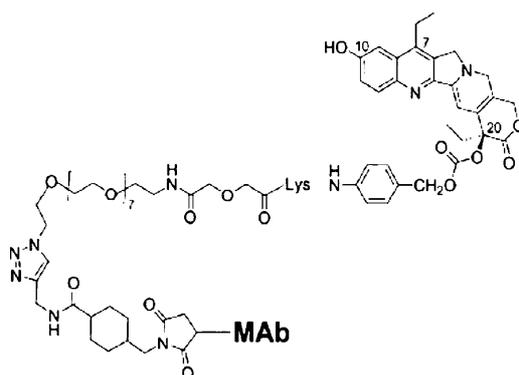


которые соединены посредством аминогруппы со следующими структурами:



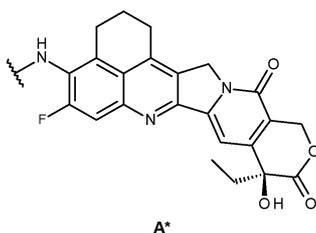
которые содержат группу PABC (пара-аминобензилоксикарбонил).

На стадии клинических испытаний находится сацитумаб говитекан (IMMU-132) компании Immunomedics (Cardillo T.M., et al., Bioconjugate Chem, 2015, 26(5), 919-931, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00223)



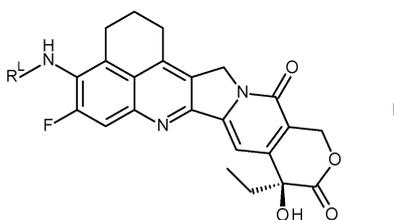
Краткое описание изобретения

В общем аспекте настоящее изобретение предусматривает конъюгат, содержащий следующее производное ингибитора топоизомеразы (A*, звено, представляющее собой лекарственное средство)

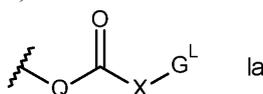


с линкером для присоединения звена, представляющего собой лиганд, где линкер присоединен посредством расщепляемой связи к аминокислотному остатку. Звено, представляющее собой антитело. Настоящее изобретение также предусматривает A* с присоединенным связывающим звеном и промежуточные соединения для их синтеза, а также высвобождаемый поражающий элемент.

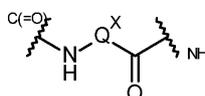
В первом аспекте настоящего изобретения предусмотрено соединение формулы I



и его соли и сольваты, где R^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд, которое выбрано из (ia)

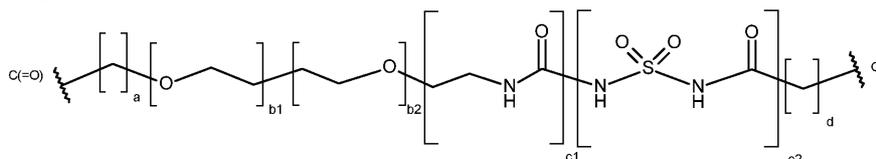


где Q представляет собой



где Q^x является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

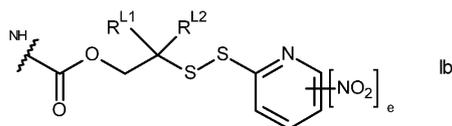
X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0 (т.е. только один из b1 и b2 может не равняться 0), и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0 (т.е. только один из c1 и c2 может не равняться 0);

G^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

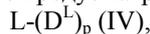
(ib)



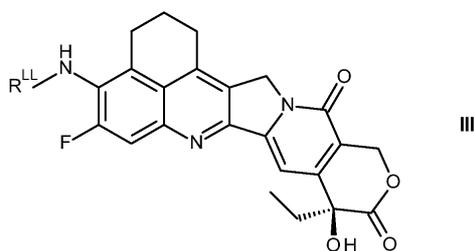
где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

Во втором аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения соединения по первому аспекту настоящего изобретения, включающий по меньшей мере одну из стадий способа, изложенных ниже.

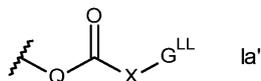
В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает конъюгаты формулы IV



или их фармацевтически приемлемые соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D^L представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III

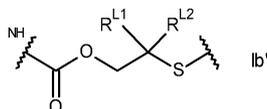


R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia')



где Q и X являются такими, как определено в первом аспекте и G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и

(ib')



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в первом аспекте; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

Соответственно, конъюгаты содержат звено, представляющее собой лиганд, ковалентно связанное с по меньшей мере одним звеном, представляющим собой лекарственное средство (A^*), посредством звена, представляющего собой линкер (т.е. звено, представляющее собой лиганд, с присоединенными одним или несколькими звеньями лекарственное средство-линкер). Звено, представляющее собой лиганд, более полно описанное ниже, представляет собой нацеливающееся средство, которое связывается с целевым фрагментом. Звено, представляющее собой лиганд, может, например, специфически связываться с клеточным компонентом (средство, связывающееся с клеткой) или с другими целевыми молекулами, представляющими интерес. Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает способы лечения, например, различных видов рака и аутоиммунного заболевания. Данные способы охватывают применение конъюгатов, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой нацеливающееся средство, которое специфически связывается с целевой молекулой. Звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой, например, белок, полипептид или пептид, такой как антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, или другое связывающее средство, такое как белок, слитый с Fc.

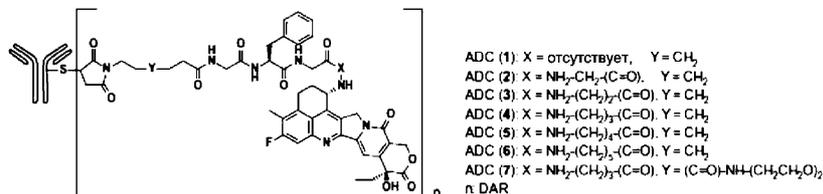
Нагрузка лекарственным средством представлена p , числом звеньев, представляющих собой лекарственное средство, приходящимся на звено, представляющее собой лиганд (например антитело). Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 звеньев, представляющих собой лекарственное средство (D), на звено, представляющее собой лиганд (например Ab или mAb). В случае композиций p представляет собой среднее значение нагрузки лекарственным средством для конъюгатов в композиции, и p находится в диапазоне от 1 до 20.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение конъюгата по третьему аспекту настоящего изобретения в изготовлении лекарственного препарата для лечения пролифератив-

ного заболевания. В четвертом аспекте также предусмотрен конъюгат по третьему аспекту настоящего изобретения для применения в лечении пролиферативного заболевания.

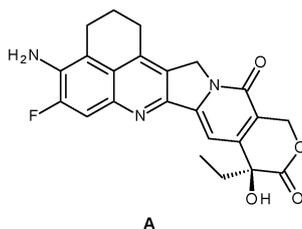
Специалист в данной области техники сможет легко определить способно или не способно кандидатное соединение лечить пролиферативное состояние в отношении любого определенного типа клеток. Например, анализы, которые могут успешно использоваться для оценки активности, обеспечиваемой определенным соединением, описаны в примерах ниже.

В Nakada, et al., Bioorg Med Chem Lett, 26 (2016), 1542-1545 (DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.02.020) рассматриваются серии ADC



и сделан вывод о том, что снижение цитотоксичности ADC (1) и (2) может быть обусловлено стericким затруднением высвобождаемого фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, в сайте, подвергающемся действию ферментов, осуществляющих деградацию, в опухолевых клетках. Данный документ объясняет важность расположения пептидной группы на расстоянии от крупного высвобождаемого фрагмента, представляющего собой лекарственное средство. Напротив, в настоящем изобретении пептидная группа присоединена непосредственно к крупному высвобождаемому фрагменту, представляющему собой лекарственное средство.

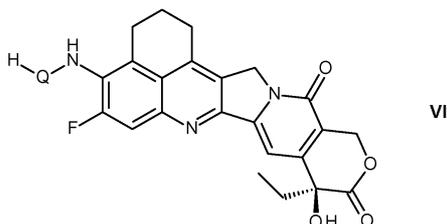
Пятый аспект настоящего изобретения представляет собой соединение А



В некоторых вариантах осуществления соединение А представлено в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

Соединение А и конъюгаты, содержащие А*, могут проявлять меньшую токсичность и более высокую эффективность в сравнении с другими известными звеньями, представляющими собой лекарственное средство, и конъюгатами. Таким образом, соединение А и конъюгаты, содержащие А*, могут проявлять улучшенное терапевтическое окно. Следовательно, соединение А может быть особенно подходящим в качестве звена, представляющего собой лекарственное средство, в частности для применения в лечении рака.

Шестой аспект настоящего изобретения представляет собой соединение формулы VI



где Q является таким, как определено в первом аспекте.

В дополнительных общих аспектах настоящее изобретение предусматривает:

(i) применение конъюгата, содержащего А*, присоединенного к звену, представляющему собой лиганд, посредством расщепляемой связи, в изготовлении лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак;

(ii) конъюгат, содержащий А*, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, посредством расщепляемой связи, для применения в лечении пролиферативного заболевания, такого как рак;

(iii) способ консервативного лечения, как, например, лечения рака, предусматривающий введение конъюгата, содержащего А*, присоединенного к звену, представляющему собой лиганд, посредством расщепляемой связи;

(iv) применение конъюгата со звеном, представляющим собой лиганд, который высвобождает А, в изготовлении лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак;

(v) конъюгат со звеном, представляющим собой лиганд, который высвобождает А, для применения

в лечении пролиферативного заболевания, такого как рак;

(vi) способ консервативного лечения, как, например, лечения рака, предусматривающий введение конъюгата со звеном, представляющим собой лиганд, который высвобождает А; и

(vii) конъюгат со звеном, представляющим собой лиганд, который высвобождает А.

Определения

C_{5-6} арилен: используемый в данном документе термин " C_{5-6} арилен" относится к двухвалентному фрагменту, полученному посредством удаления двух атомов водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения.

В данном контексте префиксы (например C_{5-6}) обозначают количество атомов кольца или диапазон значений количества атомов кольца, будь то атомы углерода или гетероатомы.

Все атомы кольца могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоариленовых группах", в таком случае группа представляет собой фенилен (C_6).

В качестве альтернативы атомы кольца могут включать один или несколько гетероатомов, как в "гетероариленовых группах". Примеры гетероариленовых групп включают без ограничения группы, полученные из:

N_1 : пиррола (азола) (C_5), пиридина (азина) (C_6);

O_1 : фурана (оксола) (C_5);

S_1 : тиафена (тиола) (C_5);

N_1O_1 : оксазола (C_5), изоксазола (C_5), изоксазина (C_6);

N_2O_1 : оксадиазола (фуразана) (C_5);

N_3O_1 : оксатриазола (C_5);

N_1S_1 : тиазола (C_5), изотиазола (C_5);

N_2 : имидазола (1,3-диазола) (C_5), пиразола (1,2-диазола) (C_5), пиридазина (1,2-диазина) (C_6), пиридина (1,3-диазина) (C_6) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C_6) и

N_3 : триазола (C_5), триазина (C_6).

C_{1-4} алкил: используемый в данном документе термин " C_{1-4} алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Используемый в данном документе термин " C_{1-n} алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до n атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин "алкил" включает подклассы алкенил, алкинил, циклоалкил и т.д., рассмотренные ниже.

Примеры насыщенных алкильных групп включают без ограничения метил (C_1), этил (C_2), пропил (C_3) и бутил (C_4).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают без ограничения метил (C_1), этил (C_2), n-пропил (C_3) и n-бутил (C_4).

Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C_3), изобутил (C_4), втор-бутил (C_4) и трет-бутил (C_4).

C_{2-4} алкенил: используемый в данном документе термин " C_{2-4} алкенил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных двойных связей.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают без ограничения этенил (винил, $-CH=CH_2$), 1-пропенил ($-CH=CH-CH_3$), 2-пропенил (аллил, $-CH-CH=CH_2$), изопротенил (1-метилвинил, $-C(CH_3)=CH_2$) и бутенил (C_4).

C_{2-4} алкинил: используемый в данном документе термин " C_{2-4} алкинил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных тройных связей.

Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают без ограничения этинил ($-C\equiv CH$) и 2-пропинил (пропаргил, $-CH_2-C\equiv CH$).

C_{3-4} циклоалкил: используемый в данном документе термин " C_{3-4} циклоалкил" относится к алкильной группе, которая также является циклильной группой, то есть к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, где фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, в том числе от 3 до 7 атомов кольца.

Примеры циклоалкильных групп включают без ограничения группы, полученные из насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

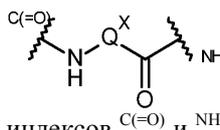
циклопропана (C_3) и циклобутана (C_4) и

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена (C_3) и циклобутена (C_4).

Маркировка связей:

в формуле



маркировка с помощью надстрочных индексов $C(=O)$ и NH обозначает группу, с которой связаны атомы. Например, группа NH показана связанной с карбонилем (который не является частью проиллюстрированного фрагмента), и карбонил показан связанным с группой NH (которая не является частью проиллюстрированного фрагмента).

Соли

Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующей соли активного соединения, например фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей рассмотрены в Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, $-COOH$ может представлять собой $-COO^-$), то может быть образована соль с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают без ограничения ионы щелочных металлов, такие как Na^+ и K^+ , катионы щелочно-земельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} . Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т.е. NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглюмина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером часто встречающегося иона четвертичного аммония является $N(CH_3)_4^+$.

Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, $-NH_2$ может представлять собой $-NH_3^+$), то может быть образована соль с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

Примеры подходящих органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, бензойной, камфорсульфоной, коричной, лимонной, эдетовой, этандисульфоновой, этансульфоной, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоной, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоной, пропионой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфаниловой, винной, толуолсульфоной, трифторуксусной и валериановой кислоты. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих полимерных кислот: дубильной кислоты, карбоксиметилцеллюлозы.

Сольваты

Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующего сольвата активного соединения. Термин "сольват" используется в данном документе в общепринятом смысле и относится к комплексу растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, то сольват может для удобства упоминаться как гидрат, например, моногидрат, дигидрат, тригидрат и т.п.

Изомеры

Определенные соединения по настоящему изобретению могут существовать в одной или нескольких конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атропомерных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая без ограничения цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и r- формы; эндо- и экзо-формы; R-, S- и мезо-формы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-)-формы; кето-, енольные- и енолятные формы; син- и анти-формы; синклинальные и антиклинальные формы; α - и β -формы; аксиальные и экваториальные формы; формы "ванна", "кресло", "твист", "конверт" - и "полукресло", и их комбинации, далее в данном документе обобщенно называемые "изомеры" (или "изомерные формы").

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые обладают свойством не совпадать со своим зеркальным отражением при наложении, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые совпадают со своим зеркальным отражением при наложении.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичный химический состав, однако различаются расположением атомов или групп в пространстве.

Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более хиральными центрами, и молекулы которого не представляют собой зеркальные отражения друг друга. Диастереомеры обладают разными физическими свойствами, например, точками плавления, точками кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереомеров можно разделять с применением высо-

кочувствительных аналитических процедур, таких как электрофорез и хроматография.

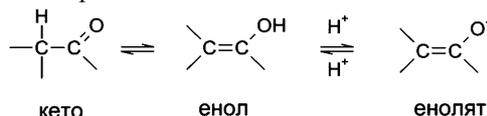
Термин "энантимеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые являются несовпадающими зеркальными отражениями друг друга.

Стереохимические определения и условные обозначения, применяемые в данном документе, в целом следуют информации, указанной в P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York и Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения по настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существуют в разных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений по настоящему изобретению, включая без ограничения диастереомеры, энантимеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, образуют часть настоящего изобретения. Множество органических соединений существуют в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(центров). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного света, где (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для заданной химической структуры данные стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Определенный стереоизомер может также называться энантимером, и смесь таких изомеров часто называется смесью энантимеров. Смесь энантимеров с соотношением 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, она может возникать при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в ходе химической реакции или процесса. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух разновидностей энантимеров, лишенных оптической активности.

Термин "энантимерно обогащенная форма" относится к образцу хирального вещества, где соотношение энантимеров составляет более чем 50:50, но менее чем 100:0.

Следует отметить, что за исключением рассмотренных ниже таутомерных форм, из используемого в данном документе термина "изомеры" специально исключены структурные (или конституционные) изомеры (т.е. изомеры, которые отличаются по связям между атомами, а не только по положению атомов в пространстве). Например, ссылку на метоксигруппу, $-\text{OCH}_3$, не следует истолковывать как ссылку на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Аналогичным образом, ссылку на орто-хлорфенил не следует истолковывать как ссылку на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на класс структур вполне может включать структурные изомерные формы, находящиеся в пределах данного класса (например C_{1-7} алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, вторичный и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеуказанное исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енольным и енолятным формам, как, например, в случае следующих таутомерных пар: кето/енол (проиллюстрированы ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/ендиамин, нитрозо/оксим, тиокетон/ентиол, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/ацинитро.



Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам, обладающим разной энергией, которые являются взаимопревращаемыми за счет низкого энергетического барьера. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают виды взаимопревращения за счет миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризация. Валентные таутомеры включают виды взаимопревращения посредством реорганизации некоторых из связывающих электронов.

Следует отметить, что в термин "изомер" специально включены соединения с одним или несколькими изотопными замещениями. Например, H может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^1H , ^2H (D) и ^3H (T); C может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{16}O и ^{18}O , и т.п.

Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как без ограничения ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Различные изотопно меченые соединения по настоящему изобретению, например соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}C . Такие изотопно меченые соединения могут быть применимы в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакции, методиках выявления или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (СПЕКТ), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в ткани, или в лечении пациентов с применением радиоактивных веществ. Меченые или замеченные дейтерием терапевтические соединения по настоящему изобретению могут обладать улучшенными

свойствами ДМПК (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства) в отношении распределения, метаболизма и выведения (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например увеличение периода полужизни *in vivo* или снижение требуемых дозировок. Меченное ^{18}F соединение может быть применимо для исследований с применением ПЕТ или СПЕКТ. Изотопно меченые соединения по настоящему изобретению и их пролекарства, могут, как правило, быть получены посредством осуществления процедур, раскрытых на схемах или в примерах и способах получения, описанных ниже, посредством замещения реагента, не являющегося изотопно меченым, легко доступным изотопно меченым реагентом. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, в частности дейтерием (т.е. ^2H или D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например, увеличение периода полужизни *in vivo*, или снижение требуемых дозировок, или увеличение терапевтического индекса. Понятно, что дейтерий в данном контексте считается заместителем. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена с помощью коэффициента изотопного обогащения. Считается, что в соединениях по настоящему изобретению любой атом, конкретно не обозначенный как определенный изотоп, представляет собой любой стабильный изотоп данного атома.

Если не указано иное, ссылка на определенное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их (полностью или частично) рацемические и другие смеси. Способы получения (например асимметрический синтез) и разделения (например фракционная кристаллизация и хроматографические способы) таких изомерных форм либо известны из уровня техники, либо их легко разрабатывать посредством адаптации способов, изложенных в данном документе, или известных способов известным образом.

Звено, представляющее собой лиганд

Звено, представляющее собой лиганд, может быть любым и включает белок, полипептид, пептид и непептидное средство, которые специфически связываются с целевой молекулой. В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой белок, полипептид или пептид. В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой циклический полипептид. Такие звенья, представляющие собой лиганд, могут включать антитела или фрагмент антитела, которые содержат по меньшей мере один сайт связывания с целевой молекулой, лимфокины, гормоны, факторы роста или любую другую молекулу или вещество, связывающиеся с клеткой, которые способны специфически связываться с мишенью.

Термины "специфически связывается" и "специфическое связывание" относятся к связыванию антитела или другого белка, полипептида или пептида с заданной молекулой (например антигеном). Как правило, антитело или другая молекула связываются с аффинностью, составляющей по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, и связываются с заданной молекулой с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем их аффинность при связывании с неспецифической молекулой (например, BSA, казеином), отличной от заданной молекулы, или близкородственной молекулой.

Примеры звеньев, представляющих собой лиганд, включают средства, описанные для применения в WO 2007/085930, которая включена в данный документ.

В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, представляет собой средство, связывающееся с клеткой, которое связывается с внеклеточной мишенью на клетке. Такое средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой белок, полипептид, пептид или непептидное средство. В некоторых вариантах осуществления средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой белок, полипептид или пептид. В некоторых вариантах осуществления средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой циклический полипептид. Средство, связывающееся с клеткой, также может представлять собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

Средство, связывающееся с клеткой

Средство, связывающееся с клеткой, может быть любым и включает пептиды и средства, отличные от пептидов. Они могут включать антитела или фрагмент антитела, которые содержат по меньшей мере один сайт связывания, лимфокины, гормоны, миметики гормонов, витамины, факторы роста, молекулы, осуществляющие транспорт питательных веществ, или любую другую молекулу или вещество, связывающиеся с клеткой.

Пептиды

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, представляет собой линейный или циклический пептид, содержащий 4-30, предпочтительно 6-20 смежных аминокислотных остатков.

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, включает пептид, который связывает интегрин $\alpha_v\beta_6$. Пептид может быть селективным в отношении $\alpha_v\beta_6$ по сравнению с XYS.

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, включает полипептид

A20FMDV-Cys. A20FMDV-Cys характеризуется последовательностью NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC.

В качестве альтернативы, можно применять вариант последовательности A20FMDV-Cys, где один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных остатков замещены другим аминокислотным остатком. Кроме того, полипептид может характеризоваться последовательностью NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Антитела

Термин "антитело" в данном документе используется в наиболее широком смысле и специально охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например биспецифические антитела), поливалентные антитела и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (Miller et al. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными от других видов. Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который обладает способностью к распознаванию определенного антигена и связыванию с ним. (Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, Нью-Йорк). Целевой антиген, как правило, имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых CDR на многочисленных антителах. Каждое антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом, имеет отличную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более чем одно соответствующее антитело. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т. е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющей интерес, или ее часть, при этом такие мишени включают без ограничения раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может представлять собой молекулу иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Иммуноглобулины могут быть получены от любых видов, в том числе они могут происходить от человека, мыши или кролика.

"Фрагменты антитела" содержат часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv; дигатела; линейные антитела; фрагменты, получаемые в экспрессионной библиотеке Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (область, определяющую комплементарность) и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеуказанных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными на один антигенный сайт. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело направлено на одну детерминанту на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они могут быть синтезированы как незагрязненные другими антителами. Модификатор "моноклональный" характеризует антитело как полученное из практически однородной популяции антител, и его не следует истолковывать как требование получения антитела посредством какого-либо определенного способа. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению по настоящему изобретению, могут быть получены посредством гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены посредством способов с применением рекомбинантной ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, описанных в Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или от трансгенных мышей, несущих полностью человеческую систему иммуноглобулинов (Lonberg (2008) *Curr. Opin.* 20(4):450-459).

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, в частности, включают химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела.

Примеры средств, связывающихся с клеткой, включают средства, описанные для применения в WO 2007/085930, которая включена в данный документ.

Опухоль-ассоциированные антигены и когнатные антитела для применения в вариантах осуществления настоящего изобретения перечислены ниже и описаны более подробно на страницах 14-86 в WO 2017/186894, которая включена в данный документ.

- (1) BMPRIВ (рецептор костного морфогенетического белка типа IB)
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5)
- (3) STEAP1 (эпителиальный антиген предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами)

- (4) 0772P (CA125, MUC16)
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцит-потенцирующий фактор, мезотелин)
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, семейство переносчиков растворенных веществ 34 (фосфат натрия), представитель 2, натрий-зависимый транспортер фосфата 3b типа II)
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, домен sema, семь тромбоспондиновых повторов (1 типа и подобные 1 типу), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B)
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, cDNA RIKEN 2700050C12, cDNA гена RIKEN 2700050C12)
- (9) ETBR (рецептор эндотелина типа B)
- (10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315)
- (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, эпителиальный антиген предстательной железы 2 с шестью трансмембранными сегментами, белок предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами)
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал 5, действующий по механизму транзитного рецепторного потенциала, подсемейство M, представитель 4)
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, полученный из тератокарциномы)
- (14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2), или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр), или Hs.73792)
- (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (ассоциированный с иммуноглобулином бета), B29)
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (якорный белок-фосфатаза 1a, содержащий домен SH2), SPAP1B, SPAP1C)
- (17) HER2 (ErbB2)
- (18) NCA (CEACAM6)
- (19) MDP (DPEP1)
- (20) IL20R-альфа (IL20Ra, ZCYTOR7)
- (21) Бревикан (BCAN, BEHAV)
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Nek5, EPHT3, Tyro5)
- (23) ASLG659 (B7h)
- (24) PSCA (предшественник антигена стволовых клеток предстательной железы)
- (25) GEDA
- (26) BAFF-R (рецептор фактора, активирующего В-клетки, рецептор BLyS 3, BR3)
- (27) CD22 (изоформа В-клеточного рецептора CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)
- (27a) CD22 (молекула CD22)
- (28) CD79a (CD79A, CD79альфа), ассоциированный с иммуноглобулином альфа, белок, специфический в отношении В-клеток, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс с молекулами Ig M на поверхности, передает сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток, pI: 4,84, MW: 25028, TM: 2 [P], ген, хромосома: 19q13.2).
- (29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, белок G-ассоциированный рецептор, который активируется с помощью хемокина CXCL13, функционирует при миграции лимфоцитов и гуморальной защите, играет роль при инфекции HIV-2 и, возможно, в развитии СПИД, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 aa, pI: 8,54, MW: 41959, TM: 7 [P], ген, хромосома: 11q23.3,
- (30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы MHC класса II (антиген Ia), которая связывает пептиды и представляет их CD4+ Т-лимфоцитам); 273 aa, pI: 6,56, MW: 30820.TM. 1 [P], ген, хромосома: 6p21.3)
- (31) P2X5 (лиганд-зависимый ионный канал 5 пуриnergического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточным АТФ, может участвовать в передаче импульса по синапсам и нейрогенезе, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора); 422 aa, pI: 7,63, MW: 47206, TM: 1 [P], ген, хромосома: 17p13.3).
- (32) CD72 (антиген CD72 дифференцировки В-клеток, Lyb-2); 359 aa, pI: 8,66, MW: 40225, TM: 1 5 [P], ген, хромосома: 9p13.3).
- (33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства белков с богатыми лейцином повторами (LRR) I типа, регулирует активацию и апоптоз В-клеток, потеря функции ассоциирована с повышением активности заболевания у пациентов с системной красной волчанкой); 661 aa, pI: 6,20, MW: 74147, TM: 1 [P], ген, хромосома: 5q12).
- (34) FcRH1 (подобный Fc-рецептору белок 1, предполагаемый рецептор Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные и ITAM-домены типа C2, может играть роль в дифференцировке В-лимфоцитов); 429 aa, pI: 5,28, MW: 46925, TM: 1 [P], ген, хромосома: 1q21-1q22)
- (35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор 2 суперсемейства иммуноглобулинов, предполагаемый иммунорецептор с возможной ролью в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена посредством транслокации происходит в некоторых В-клеточных злокачественных ново-

образованиях); 977 aa, pI: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P], ген, хромосома: 1q21)

(36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1, TR, предполагаемый трансмембранный протеогликан, родственный семейству факторов роста EGF/херегулин и фоллистатину); 374 aa)

(37) PSMA - FOLH1 (фолатгидролаза (специфический мембранный антиген предстательной железы) 1)

(38) SST (рецептор соматостатина; примечание: существует 5 подтипов)

(38.1) SSTR2 (рецептор соматостатина 2)

(38.2) SSTR5 (рецептор соматостатина 5)

(38.3) SSTR1

(38.4) SSTR3

(38.5) SSTR4 AvB6 - обе субъединицы (39+40)

(39) ITGAV (интегрин, альфа V)

(40) ITGB6 (интегрин, бета 6)

(41) CEACAM5 (молекула клеточной адгезии 5, родственная карциноэмбриональному антигену)

(42) MET (протоонкоген met; рецептор фактора роста гепатоцитов)

(43) MUC1 (муцин 1, ассоциированный с клеточной поверхностью)

(44) CA9 (карбоангидраза IX)

(45) EGFRvIII (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант транскрипта 3,

(46) CD33 (молекула CD33)

(47) CD19 (молекула CD19)

(48) IL2RA (рецептор интерлейкина 2, альфа); эталонная последовательность NCBI: NM_000417.2);

(49) AXL (рецепторная тирозинкиназа AXL)

(50) CD30 - TNFRSF8 (суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, представитель 8)

(51) BCMA (антиген созревания В-клеток) - TNFRSF17 (суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, представитель 17)

(52) CT Ag - CTA (раково-тестикулярные антигены)

(53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3 (фукозилтрансфераза 3 (галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза, группа крови Льюиса)

(54) CLEC14A (семейство 14 с лектиновым доменом типа C, представитель A; номер доступа в Genbank NM175060)

(55) GRP78 - HSPA5 (белок теплового шока 5 с молекулярной массой 70 кДа (регулируемый глюкозой белок, 78 кДа)

(56) CD70 (молекула CD70) L08096

(57) специфические антигены стволовых клеток.

Например:

5T4 (см. элемент списка (63) ниже)

CD25 (см. элемент списка (48) выше)

CD32

LGR5/GPR49

промидин/CD133

(58) ASG-5

(59) ENPP3 (эктонуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза 3)

(60) PRR4 (богатый пролином белок 4 (слезная железа))

(61) GCC - GUCY2C (гуанилатциклаза 2C (рецептор термостабильного энтеротоксина)

(62) Liv-1 - SLC39A6 (семейство переносчиков растворенных веществ 39 (транспортер цинка), представитель 6)

(63) 5T4, гликопротеин трофобластов, TPBG - TPBG (гликопротеин трофобластов)

(64) CD56 -NCMA1 (молекула адгезии нервных клеток 1)

(65) CanAg (опухоль-ассоциированный антиген CA242)

(66) FOLR1 (рецептор фолата 1)

(67) GPNMB (гликопротеин (трансмембранный) gpm)

(68) TIM-1 -HAVCR1 (клеточный рецептор 1 вируса гепатита А)

(69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1

(70) B7-H4 - VTCN1 (содержащий V-образный домен ингибитор активации Т-клеток 1)

(71) PTK7 (PTK7 протеинтирозинкиназа 7)

(72) CD37 (молекула CD37)

(73) CD138 - SDC1 (синдекан 1)

(74) CD74 (молекула CD74, главный комплекс гистосовместимости, инвариантная цепь класса II)

(75) клаудины - CL (клаудины)

(76) EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (гомолог 3 вирусного онкогена при эритробластном лейкозе v-erb-b2 (птичий))

- (78) RON - MST1R (стимулирующий макрофаги рецептор 1 (тирозинкиназа, родственная c-met))
- (79) EPHA2 (рецептор EPH A2)
- (80) CD20-MS4A1 (трансмембранные домены 4, подсемейство A, представитель 1)
- (81) тенасцин C - TNC (тенасцин C)
- (82) FAP (белок активации фибробластов, альфа)
- (83) DKK-1 (гомолог Dickkopf 1 (*Xenopus laevis*))
- (84) CD52 (молекула CD52)
- (85) CS1 - SLAMF7 (представитель 7 семейства SLAM)
- (86) эндоглин - ENG (эндоглин)
- (87) аннексин A1 - ANXA1 (аннексин A1)
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (молекула адгезии сосудистого эндотелия 1)

Дополнительными опухоль-ассоциированным антигеном и когнатными антителами, представляющими интерес, являются:

- (89) ASCT2 (транспортер ASC 2, также известный как SLC1A5).

Антитела ASCT2 описаны в WO 2018/089393, которая включена в данный документ посредством ссылки

Средство, связывающееся с клеткой, может быть меченым, например, для облегчения выявления или очистки средства либо до встраивания в виде конъюгата, либо в виде части конъюгата. Метка может представлять собой биотиновую метку. В другом варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, может быть меченным радиоактивным изотопом.

Способы лечения

Конъюгаты по настоящему изобретению можно использовать в способе терапии. Также предусмотрен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества конъюгата формулы IV. Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество, достаточное для того, чтобы продемонстрировать пользу для пациента. Такая польза может представлять собой по меньшей мере снижение интенсивности по меньшей мере одного симптома. Реально вводимое количество, а также скорость и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например принятие решений о дозах, находится в пределах компетенции врачей общей практики и других врачей.

Конъюгат можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Примеры видов лечения и терапии включают без ограничения химиотерапию (введение активных средств, включая, например, лекарственные средства), хирургическое лечение и лучевую терапию.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и для применения по настоящему изобретению могут содержать, в дополнение к активному ингредиенту, т.е. конъюгату формулы IV, фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, широко известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны противодействовать эффективности активного ингредиента. Конкретная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или может осуществляться посредством инъекции, например, внутривенной, подкожной или внутримышечной.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, продукты переработки нефти, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения активный ингредиент будет находиться в форме водного раствора, приемлемого для парентерального введения, который не содержит пирогенов и характеризуется подходящим значением pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники могут получить пригодные растворы с применением, например, изотонических сред, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор лактата Рингера для инъекций. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть включены при необходимости.

Конъюгаты можно использовать для лечения пролиферативного заболевания и аутоиммунного заболевания. Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, как, например, неопластический или гиперпластический рост, будь то *in vitro* или *in vivo*.

Примеры пролиферативных состояний включают без ограничения клеточную пролиферацию доброкачественного, предракового и злокачественного характера, в том числе без ограничения новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), виды рака (например, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой

кишки, карциному молочной железы, карциному яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), виды лейкоза, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например соединительных тканей) и атеросклероз. Другие виды рака, представляющие интерес, включают без ограничения злокачественные состояния системы крови, такие как виды лейкоза и лимфомы, например, неходжкинскую лимфому и ее подтипы, такие как DLBCL, лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома из клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфому Ходжкина, AML и другие виды рака В- или Т-клеточного происхождения. Любой тип клеток может подвергаться лечению, в том числе без ограничения клетки легкого, желудочно-кишечного тракта (в том числе, например, кишечника, толстой кишки), молочной железы (маммарные), яичника, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

Примеры аутоиммунного заболевания включают следующие: ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), псориатический артрит, эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, системную красную волчанку, миастению гравис, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное нарушение печени, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона), анафилаксию, аллергическую реакцию, синдром Шегрена, сахарный диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгию, полимиозит, дерматомиозит, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозную анемию, атрофию желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострую кожную красную волчанку, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гемолитическую анемию, вульгарную пузырчатку, пузырчатку, герпетический дерматит, гнездную алопецию, пемфигоид, склеродермию, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартерит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическую лихорадку, астму, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, "легкое фермера", многоформную эритему, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, "легкое пищевода", токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легкого, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, трансфузионную реакцию, артериит Такаясу, ревматоидную полимиалгию, темпоральный артериит, шистосомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзему, лимфоматозный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, лихорадку денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндокардиальный фиброз, эндофталмит, стойкую возвышающуюся эритему, псориаз, эритробластоз плода, эозинофильный фасцит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохромный циклит, циклит Фукса, IgA-нефропатию, пурпуру Шенлейна-Геноха, заболевание "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатию, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемию, макроглобулинемию Вальденстрема, синдром Эванса и аутоиммунную гонадную недостаточность.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой нарушение, связанное с В-лимфоцитами (например, системную красную волчанку, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа), Th1-лимфоцитами (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез или заболевание "трансплантат против хозяина") или Th2-лимфоцитами (например, атопический дерматит, системную красную волчанку, атопическую астму, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз или хроническое заболевание "трансплантат против хозяина"). В целом нарушения, связанные с дендритными клетками, включают нарушения, связанные с Th1-лимфоцитами и Th2-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное нарушение представляет собой иммунологическое нарушение, опосредованное Т-клетками.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, применимое в лечении рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических средств включают без ограничения алкилирующие средства, антиметаболиты, растительные алкалоиды на основе яда, воздействующего на веретено деления, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизирующие средства и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические средства включают соединения, применяемые в "направленной терапии" и традиционной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических средств включают эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS № 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS № 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, ди-

хлорплатина (II), CAS № 15663-27-1), карбоплатин (CAS № 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS № 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), и доксорубин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, и рапамицин.

Дополнительные примеры химиотерапевтических средств включают оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), иматиниба мезилат (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), РТК787/ЗК 222584 (Novartis), фульвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремафора), составы на основе паклитаксела на основе сконструированных с альбумином наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепу и циклофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотecin (в том числе синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин I и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретаминоксид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры энединовых антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутирамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубин, цианоморфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин и дезоксидоксорубин, эпирубицин, зорурубицин, идарубин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; вещества, подавляющие деятельность надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; этилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдотраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангиудин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепу; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; эпозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдотраксат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, ки-

слоты и производные любого из вышеуказанного.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены (I) антигормональные средства, которые действуют посредством регуляции или подавления действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), в том числе, например, тамоксифен (в том числе NOLVADEX®; цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (цитрат торемифина); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® (ацетат мегестрола), AROMASIN® (эксеместан; Pfizer), форместан, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novartis) и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); (iv) ингибиторы протеинкиназ, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназ; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые подавляют экспрессию генов в сигнальных путях, задействованных в нарушении пролиферации клеток, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимержен (GENA SENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® и VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы I, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (AVASTEST®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTEST®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idee), пертузумаб (OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTEST®, Genentech), тозитумомаб (Vexxar, Cogixia) и конъюгат антитело-лекарственное средство гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела с терапевтическим потенциалом в качестве химиотерапевтических средств в комбинации с конъюгатами по настоящему изобретению включают алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеузумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертансин, кантузумаб мертансин, целелизумаб, цертолизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эспратузумаб, эрлизумаб, фелвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогамидин, инотузумаб озогамидин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, ресивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, сиплизумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкин, тукузитузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Составы

В то время как является возможным отдельное применение (например введение) конъюгата, часто предпочтительным является представление его в виде композиции или состава.

В одном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, состав, препарат, лекарственный препарат), содержащую конъюгат, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат, описанный в данном документе, вместе с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, широко известными специалистам в данной области техники, в том числе без ограничения фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными веществами, адъювантами, наполнителями, буферами, консервантами, антиоксидантами, смазывающими средствами, стабилизирующими средствами, солюбилизующими средствами, поверхностно-активными веществами (например смачивающими средствами), маскирующими средствами, красителями, ароматизаторами и подсластителями.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит другие активные средства, например другие терапевтические или профилактические средства.

Информацию о подходящих носителях, разбавителях, вспомогательных веществах и т. п. можно найти в стандартных фармацевтических источниках литературы. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2-е издание (под ред. M. Ash и I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Нью-Йорк, США), Remington's Pharmaceutical Excipients, 20-е издание, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2-е издание, 1994.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения фармацевтической композиции, включающим смешивание по меньшей мере одного меченого радиоактивным изотопом [¹¹C] конъюгата или подобного конъюгату соединения, определенного в данном документе, с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, широко известными специалистам в

данной области техники, например, носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и т.д. В случае составления в виде дискретных единиц (например таблеток и т.п.), каждая единица содержит заданное количество (дозу) активного соединения.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, дозированным лекарственным формам и т.п., которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями указанного субъекта (например человека), при этом не вызывая чрезмерную токсичность, раздражение, аллергическую реакцию или другую проблему или осложнение, соизмеримые с обоснованным соотношением польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и т.п. также должны быть "приемлемыми" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава.

Составы могут быть получены посредством любых способов, широко известных в области фармацевтики. Такие способы включают стадию приведения активного соединения в контакт с носителем, который состоит из одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. В целом составы получают посредством однородного и непосредственного приведения активного соединения в контакт с носителем (например, жидкими носителями, тонкоизмельченным твердым носителем и т.п.) и последующего придания продукту формы при необходимости.

Может быть получен состав, предусматривающий быстрое или медленное высвобождение; немедленное, замедленное, отсроченное или пролонгированное высвобождение или их комбинацию.

Составы, подходящие для парентерального введения (например посредством инъекции), включают водные или неводные изотонические апирогенные стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых растворен, суспендирован или иным образом представлен активный ингредиент (например в липосоме или другой микрочастице). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизирующие средства, бактериостатические средства, суспендирующие средства, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови (или другой соответствующей биологической жидкости) предполагаемого реципиента. Примеры вспомогательных веществ включают, например, воду, спирты, многоатомные спирты, глицерин, растительные масла и т.п. Примеры подходящих изотонических носителей для применения в таких составах включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера или раствор лактата Рингера для инъекций. Как правило, концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 мкг/мл, например от приблизительно 10 до приблизительно 1 мкг/мл. Составы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметично закрытых контейнерах, например ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном посредством сублимации (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные растворы и суспензии для инъекций могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Доза

Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящие дозы конъюгатов и композиций, содержащих конъюгаты, могут варьироваться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозы, как правило, включает уравнивание терапевтической пользы по отношению к любому риску или пагубным побочным эффектам. Выбранный уровень дозы будет зависеть от разнообразных факторов, в том числе без ограничения активности определенного соединения, пути введения, времени введения, скорости выведения соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации, степени тяжести состояния и вида, пола, возраста, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента. Количество соединения и путь введения в конечном счете будут оставлены на усмотрение врача, ветеринара или клинициста, однако, как правило, доза будет подбираться с целью достижения значений локальной концентрации в месте действия, которые обеспечивают достижение требуемого эффекта, не вызывая существенных вредных или пагубных побочных эффектов.

Введение может осуществляться в виде одной дозы, непрерывно или с перерывами (например в виде разделенных доз через подходящие интервалы времени) на протяжении курса лечения. Способы определения наиболее эффективных способов и дозы введения хорошо известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, применяемого для терапии, цели терапии, клетки-мишени (клеток-мишеней), подлежащей лечению, и субъекта, подлежащего лечению. Однократное или многократное введение может осуществляться с применением уровня дозы и схемы, выбранных лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

В целом подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от приблизительно 100 нг до приблизительно 25 мг (более типично от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг) в день в расчете на килограмм веса тела субъекта. В случае, если активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или т.п., вводимое количество рассчитывается по исходному соединению и, таким образом, фактический применяемый вес увеличивается пропорционально.

Величины доз, описанные выше, могут применяться в отношении конъюгата или эффективного ко-

личества соединения, которое высвобождается после расщепления линкера.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза ADC по настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят молекулу в превентивных или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза пациента и реакции на антитело, а также от усмотрения лечащего врача. Молекула подходящим образом вводится пациенту однократно или в ходе ряда курсов лечения. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, количество молекул, составляющее от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или больше, представляет собой исходную дозу кандидата для введения пациенту, будь то, например, посредством одного или нескольких отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продлевается до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания. Другие схемы дозирования могут быть применимыми. Ход данной терапии легко поддается мониторингу посредством традиционных методик и анализов.

Нагрузка лекарственным средством

Нагрузка лекарственным средством (p) представляет собой среднее количество лекарственного средства, приходящееся на звено, представляющее собой лиганд, которое может представлять собой средство, связывающееся с клеткой, например антитело.

Среднее количество лекарственного средства, приходящееся на антитело, в препаратах ADC, полученных посредством реакций конъюгации, может быть охарактеризовано посредством традиционных способов, таких как UV, HPLC с обращенной фазой, HIC, масс-спектрометрия, анализ ELISA и электрофорез. Количественное распределение ADC с точки зрения p также может быть определено. С помощью ELISA может быть определено усредненное значение p в определенном препарате ADC (Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений p (лекарственного средства) не различимо посредством связывания антитела с антигеном и предела выявления ELISA. Кроме того, применение анализа ELISA для выявления конъюгатов антитело-лекарственное средство не обеспечивает определения места присоединения фрагментов лекарственного средства к антителу, например фрагментов легкой цепи или тяжелой цепи или определенных аминокислотных остатков. В некоторых случаях разделение, очистка и определение характеристик однородного ADC, где p представляет собой определенное значение, полученное для ADC с нагрузками другим лекарственным средством, могут осуществляться посредством таких способов, как HPLC с обращенной фазой или электрофорез. Такие методики также применимы в отношении других типов конъюгатов.

В случае некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство значение p может ограничиваться количеством сайтов присоединения на антителе. Например, антитело может содержать только одну или несколько тиольных групп цистеина или может содержать только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, посредством которых линкер может быть присоединен. Более высокая нагрузка лекарственным средством может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю способности к проникновению в клетку для определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, в ходе реакции конъюгации с антителом конъюгируется менее чем теоретически максимальное количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство. Антитело может содержать, например, множество остатков лизина, которые не реагируют с линкером лекарственного средства. Только наиболее реакционноспособные группы лизина способны реагировать с реакционноспособным в отношении амина линкерным реагентом. Кроме того, только наиболее реакционноспособные тиольные группы цистеина способны реагировать с реакционноспособным в отношении тиола линкерным реагентом. В целом антитела не содержат множество или вообще не содержат свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть присоединены к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство. Большинство тиольных остатков цистеина в антителах соединений существуют в виде дисульфидных мостиков и их количество должно быть сокращено с помощью восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT) или TCEP, в частично или полностью восстанавливающих условиях. Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) ADC можно регулировать несколькими разными способами, включающими (i) ограничение молярного избытка линкера лекарственного средства по отношению к антителу, (ii) ограничение времени или температуры протекания реакции конъюгации и (iii) частичные или ограничивающие восстанавливающие условия для модификации тиольной группы цистеина.

Некоторые антитела содержат восстанавливаемые межцепочечные дисульфидные связи, т. е. цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реакционноспособными в отношении конъюгации с линкерными реагентами посредством обработки восстановителем, таким как DTT (дитиотреитол). Каждый цистеиновый мостик, таким образом, будет теоретически образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитела посредством осуществления реакции остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно вводить в антитело (или его фрагмент) по-

средством конструирования одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например посредством получения мутантных антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатков цистеина). В US 7521541 описано конструирование антител посредством введения реакционно-способных аминокислот, представляющих собой цистеин.

Аминокислоты, представляющие собой цистеин, могут быть сконструированы в реакционно-способных сайтах антитела, а также таким образом, чтобы они не образовывали внутрицепочечных или межмолекулярных дисульфидных связей (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249). Тиольные группы сконструированных остатков цистеина способны реагировать с линкерами лекарственного средства по настоящему изобретению (т.е. формулы I), которые содержат реакционноспособные в отношении тиола электрофильные группы, такие как малеимид или альфа-галогенамиды, с образованием ADC с антителами со сконструированными остатками цистеина. Местоположение звена, представляющего собой лекарственное средство, таким образом, может быть разработанным, контролируемым и известным. Нагрузку лекарственным средством можно контролировать, так как тиольные группы сконструированного цистеина, как правило, реагируют с реагентами лекарственного средство-линкер с высоким выходом. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты, представляющей собой цистеин, посредством замены в одном сайте на тяжелой или легкой цепи обеспечивает получение двух новых остатков цистеина на симметричном антителе. Нагрузка лекарственным средством, близкая к 2, может быть достигнута с почти однородностью продукта конъюгации ADC.

В случае, если более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела реагирует с линкерами лекарственного средства, полученный продукт может представлять собой смесь соединений ADC с распределением звеньев, представляющих собой лекарственное средство, присоединенных к антителу, например 1, 2, 3 и т.д. Пособием способов жидкостной хроматографии, таких как хроматография с полимерной обращенной фазой (PLRP) и хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC), можно разделять соединения в смеси по значению нагрузки лекарственным средством. Препараты ADC с одним значением (p) нагрузки лекарственным средством могут быть выделены, однако такие ADC с одним значением нагрузки все еще могут представлять собой неоднородные смеси, поскольку звенья, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены посредством линкера к разным сайтам антитела.

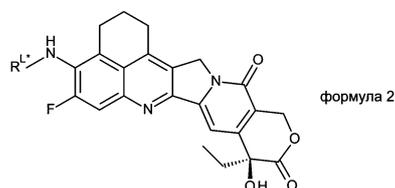
Таким образом, композиции на основе конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут содержать смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, где антитело содержит один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, и где фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены к антителу по разным аминокислотным остаткам.

В одном варианте осуществления среднее количество лекарственных средств, приходящееся на средство, связывающееся с клеткой, находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления диапазон выбран из диапазона от 1 до 10, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6 и от 2 до 10.

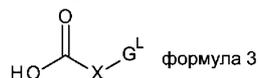
В некоторых вариантах осуществления на средство, связывающееся с клеткой, приходится одно лекарственное средство.

Общие пути синтеза

Соединения формулы I, где R^L представлен формулой Ia, могут быть синтезированы из соединения формулы 2



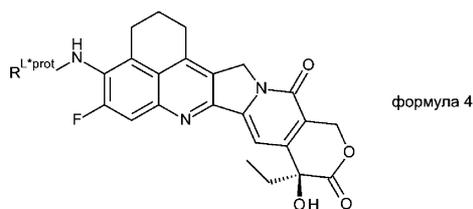
где R^{L*} представляет собой -QH за счет присоединения к соединению формулы 3



или его активированную версию.

Такую реакцию можно осуществлять в условиях, способствующих образованию амидной связи.

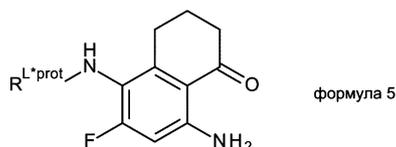
Соединения формулы 2 можно синтезировать посредством удаления защитной группы из соединения формулы 4



формула 4

где R^{L*prot} представляет собой $-Q-Prot^N$, где $Prot^N$ представляет собой защитную группу для аминогруппы.

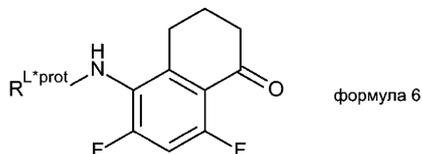
Соединения формулы 4 могут быть синтезированы посредством реакции сочетания соединения формулы 5



формула 5

с соединением А5 с применением реакции Фридлендера.

Соединения формулы 5 можно синтезировать из соединений формулы 6



формула 6

путем превращения группы, представляющей собой атом фтора, в аминогруппу, например, путем обработки с помощью NH_4OH .

Соединения формулы 6 можно синтезировать посредством реакции сочетания R^{L*prot} . OH с соединением А3.

Соединения формулы I, где R^L представлен формулой Ia или Ib, можно синтезировать из соединения 1 посредством реакции сочетания с соединением R^L-OH или его активированной формой.

Защитные группы для аминогруппы

Защитные группы для аминогруппы широко известны специалистам в данной области техники. Особое внимание обращается на раскрытие подходящих защитных групп в Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, четвертое издание, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), страницы 696-871.

Дополнительные предпочтения

Следующие предпочтения можно применять ко всем аспектам настоящего изобретения, как описано выше, или они могут относиться к отдельному аспекту. Предпочтения могут быть объединены вместе в любой комбинации.

Q^X .

В одном варианте осуществления Q представляет собой аминокислотный остаток. Аминокислота может представлять собой природную аминокислоту или не природную аминокислоту.

В одном варианте осуществления Q выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

В одном варианте осуществления Q включает дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и не природных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления дипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то дипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

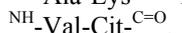
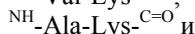
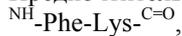
В одном варианте осуществления Q выбран из

$NH-C(=O)-Phe-Lys-$
 $NH-C(=O)-Val-Ala-$
 $NH-C(=O)-Val-Lys-$
 $NH-C(=O)-Ala-Lys-$
 $NH-C(=O)-Val-Cit-$
 $NH-C(=O)-Phe-Cit-$
 $NH-C(=O)-Leu-Cit-$
 $NH-C(=O)-Ile-Cit-$
 $NH-C(=O)-Phe-Arg-$
 $NH-C(=O)-Trp-Cit-$

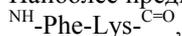


где Cit представляет собой цитруллин.

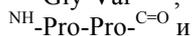
Предпочтительно Q выбран из



Наиболее предпочтительно Q выбран из

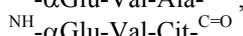
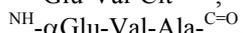
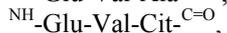
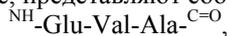


Другие комбинации дипептидов, представляющие интерес, включают

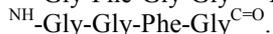
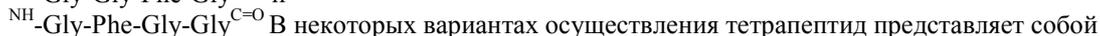
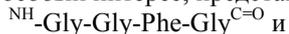


Могут применяться другие комбинации дипептидов, в том числе комбинации, описанные в Dubowchik et al., Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869, которая включена в данный документ посредством ссылки.

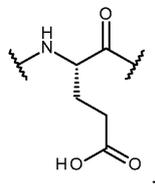
В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то трипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Трипептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой



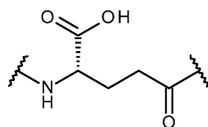
В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой тетрапептидный остаток. Аминокислоты в тетрапептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления тетрапептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то тетрапептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, тетрапептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Тетрапептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой



На представленных выше изображениях пептидных остатков NH- представляет собой N-конец, и -C=O представляет собой C-конец остатка. C-конец связан с NH из A*. Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты, т.е.



αGlu представляет собой остаток глутаминовой кислоты при связывании посредством α -цепи, т.е.



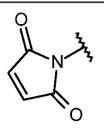
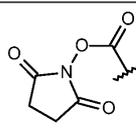
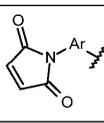
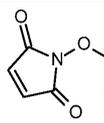
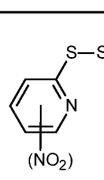
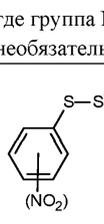
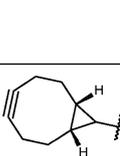
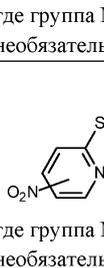
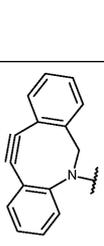
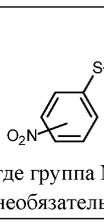
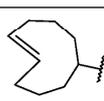
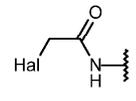
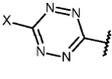
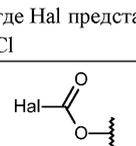
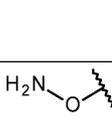
В одном варианте осуществления при необходимости боковая цепь аминокислоты является химически защищенной. Защитная группа для боковой цепи может представлять собой группу, рассмотренную выше. Защищенные аминокислотные последовательности являются расщепляемыми с помощью ферментов. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с защитой боковой цепи с помощью Boc, является расщепляемой с помощью катепсина.

Защитные группы для боковых цепей аминокислот широко известны из уровня техники, описаны в

каталоге Novabiochem и являются такими, как описано выше.

G^L :

G^L может быть выбран из

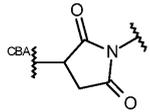
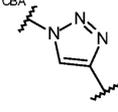
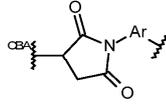
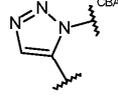
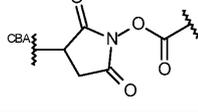
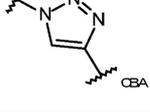
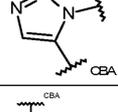
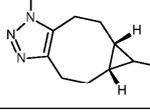
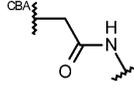
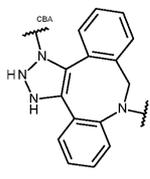
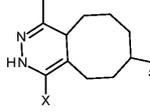
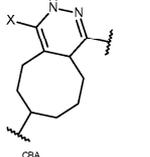
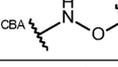
(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 где группа NO_2 является необязательной	(G^{L9})	
(G^{L3-2})	 где группа NO_2 является необязательной	(G^{L10})	
(G^{L3-3})	 где группа NO_2 является необязательной	(G^{L11})	
(G^{L3-4})	 где группа NO_2 является необязательной	(G^{L12})	
(G^{L4})	 где Hal представляет собой I, Br, Cl	(G^{L13})	
(G^{L5})		(G^{L14})	

где Ar представляет собой C_{5-6} -ариленовую группу, например фенилен, и X представляет собой C_{1-4} -алкил.

В некоторых вариантах осуществления G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2} . В некоторых из данных вариантов осуществления G^L представляет собой G^{L1-1} .

G^{LL} :

G^{LL} может быть выбран из

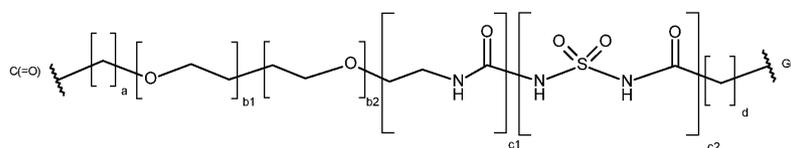
(G ^{LL1-1})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL11})	
(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу, например фенилен, и X представляет собой C₁₋₄алкил.

В некоторых вариантах осуществления G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}. В некоторых из данных вариантов осуществления G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

X:

X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0, и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0;

a может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления a равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления a равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 0.

b1 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b1 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b1 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b2 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0-8 и

может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

Только один из b1 и b2 может не равняться 0.

c1 может равняться 0 или 1.

c2 может равняться 0 или 1.

Только один из c1 и c2 может не равняться 0.

d может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления d равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления d равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 5.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, и d равняется 2, и b2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и d равняется 0, и b1 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и d равняется 1, и b2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X b1 равняется 0, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и один из a и d равняется 0. Другой из a и d равняется 1-5. В некоторых из данных вариантов осуществления другой из a и d равняется 1. В других из данных вариантов осуществления другой из a и d равняется 5.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2, и b1 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления R^L представлен формулой Ib.

В некоторых вариантах осуществления R^{L1} представлен формулой Ib'.

R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

В некоторых вариантах осуществления R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой H.

В некоторых вариантах осуществления R^{L1} представляет собой H, и R^{L2} представляет собой метил.

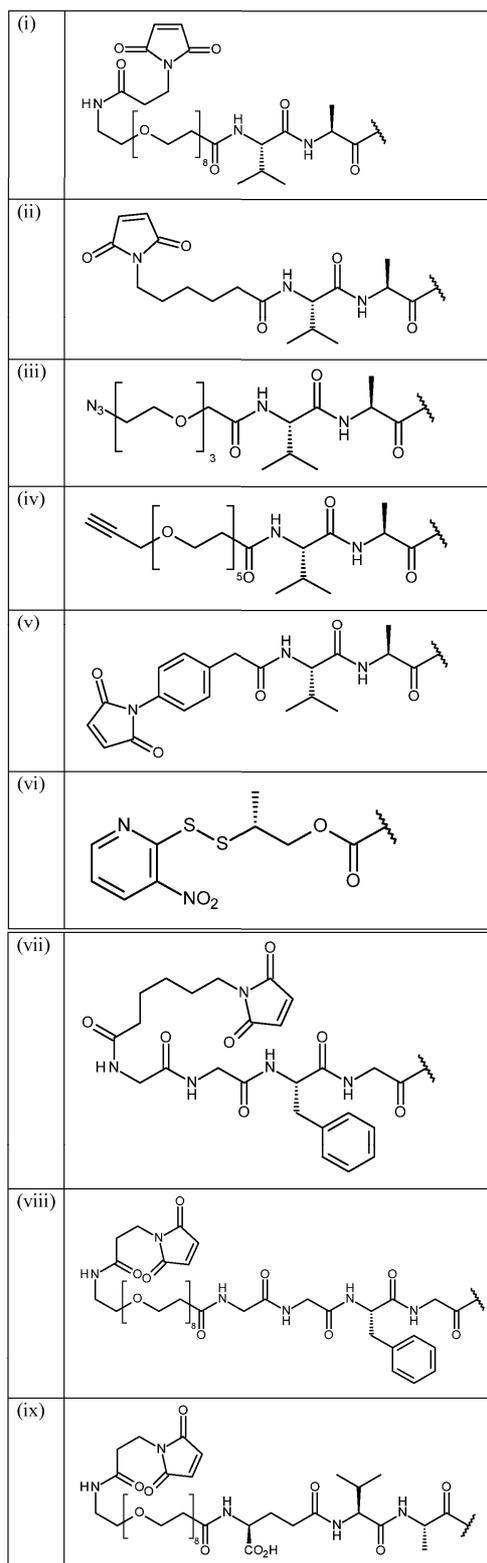
В некоторых вариантах осуществления R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой метил.

В некоторых вариантах осуществления R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

В некоторых вариантах осуществления R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

В группе Ib в некоторых вариантах осуществления e равняется 0. В других вариантах осуществления e равняется 1, и нитрогруппа может находиться в любом доступном положении кольца. В некоторых из данных вариантов осуществления она находится в орто-положении. В других из данных вариантов осуществления она находится в пара-положении.

В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта настоящего изобретения энантимерно обогащенная форма характеризуется соотношением энантимеров, составляющим более чем 60:40, 70:30, 80:20 или 90:10. В дополнительных вариантах осуществления соотношение энантимеров составляет более чем 95:5, 97:3 или 99:1. В некоторых вариантах осуществления R^L выбран из



В некоторых вариантах осуществления R^{II} представляет собой группу, полученную из групп R^L , указанных выше.

Примеры

Колоночную хроматографию на силикагеле проводили с применением силикагеля Qingdao Hailang или с применением Biotage® Isolera™ и фракций, проверенных на чистоту с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). TLC проводили с применением силикагеля Huanghai HSF254 или силикагеля Merck Kieselgel 60 F254 с флуоресцентным индикатором на стеклянной пластине. Визуализацию TLC осуществляли с помощью УФ-излучения. Растворители для экстракции и хроматографии и все химические вещества в чистом виде приобретали и применяли без дополнительной очистки в SINOPHARM (China), VWR (US) или Sigma-Aldrich (US), если не указано иное. 6,8-Дифтор-3,4-дигидронафталин-

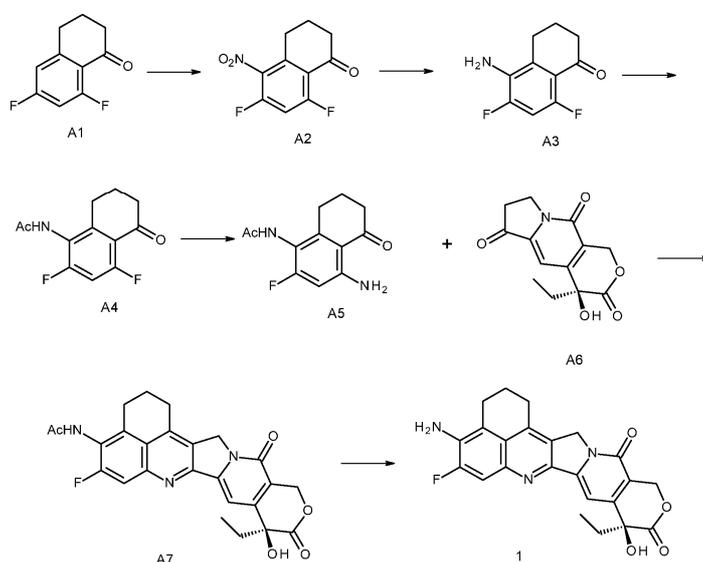
1(2H)-он получали от Bide Pharmatech Ltd.

Очистку с обращенной фазой проводили на системе Waters Prep HPLC, состоящей из Waters 2767, Waters 2545, насосов для HPLC Waters 515, WATERS SFO, WATERS 2424, Acquity QDa с программным обеспечением MassLynx.

Аналитические условия LC/MS являлись следующими. Масс-спектрометрию с электрораспылением в режиме детекции положительно заряженных ионов проводили с применением Waters Aquity H-класс SQD2. Применяемыми подвижными фазами были растворитель А (вода с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты). Прогон градиента в течение 5 мин: исходный состав с 5% В удерживали в течение 1 мин, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 95% В в течение периода времени, составлявшего 3 мин. Состав удерживали в течение 30 с при 95% В, затем возвращали до 5% В за 30 с и удерживали при данном значении в течение 84 с. Общая продолжительность прогона градиента составляла 5,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Колонки: Agilent ZORBAX Extend 80A 1,8 мкм 2,1×50 мм при 45°C.

Условия при прогоне градиента в течение 3 мин: Скорость потока составляла 0,3 мл/мин. Детекцию осуществляли при 210 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 35°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield C18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм×5 мм.

Пример 1.



а) 6,8-Дифтор-5-нитро-1-тетралон А2

К порошку 6,8-дифтор-1-тетралона А1 (15 г, 82,3 ммоль) добавляли по каплям концентрированную H_2SO_4 (90 мл) при 0°C. К полученной смеси порциями добавляли KNO_3 (8,2 г, 90,1 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Реакцию гасили с помощью ледяной воды (200 мл) и затем экстрагировали с помощью EtOAc (400 мл×3). Объединенные органические слои промывали с помощью водного раствора NaHO_3 (400 мл) и солевого раствора (400 мл), высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир/ EtOAc =100:1) с получением соединения А2 (8,1 г, выход 43%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ ppm 6,98 (t, $J=10,0$ Гц, 1H), 3,01-2,98 (m, 2H), 2,72-2,68 (m, 2H), 2,21-2,05 (m, 2H).

б) 5-Амино-6,8-дифтор-1-тетралон А3

К смеси соединения А2 (9,1 г, 39,6 ммоль) в $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:1, 270 мл) добавляли NH_4Cl (6,4 г, 0,12 моль) и порошок железа (17,6 г, 0,32 моль). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли водой (50 мл) и затем экстрагировали с помощью EtOAc (200 мл×3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир/ EtOAc =8:1) с получением соединения А3 (7,3 г, выход 94%). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 7,04 (t, $J=11,6$ Гц, 1H), 5,05 (br s, 2H), 2,71-2,2,68 (m, 2H), 2,5 (m, 2H), 2,03-1,98 (m, 2H).

в) 5-Ацетиламино-6,8-дифтор-1-тетралон А4

К раствору соединения А3 (7,3 г, 37 ммоль) и Et_3N (4,5 г, 44,4 ммоль) в DCM (100 мл) добавляли по каплям Ac_2O (4,5 г, 44,4 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (DCM/MeOH =300:1) с получением со-

единения А4 (5,3 г, выход 60%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ ppm 6,84 (t, $J=10$ Гц, 1H), 6,75 (br s, 1H), 2,89-2,86 (m, 2H), 2,66-2,63 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,10-2,06 (m, 2H).

d) 5-Ацетиламино-6-фтор-8-амино-1-тетралон А5

К раствору соединения А4 (5,2 г, 21,7 ммоль) в DMSO (50 мл) добавляли 25% водный раствор NH_4OH (80 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 130°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и затем экстрагировали с помощью EtOAc (200 мл x 5). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (DCM/MeOH=100:1) с получением соединения А5 (1,5 г, выход 30%) в виде коричневатого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ ppm 9,16 (s, 1H), 6,42 (d, $J=12,4$ Гц, 1H), 2,66 (m, 2H), 2,55-2,48 (m, 2H), 2,00 (s, 3H), 1,88-1,85 (m, 2H).

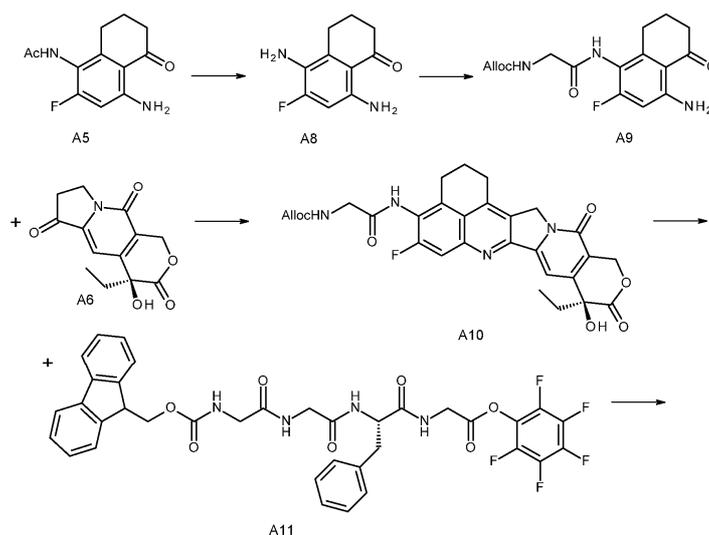
e) (S)-N-(9-Этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)ацетамид А7

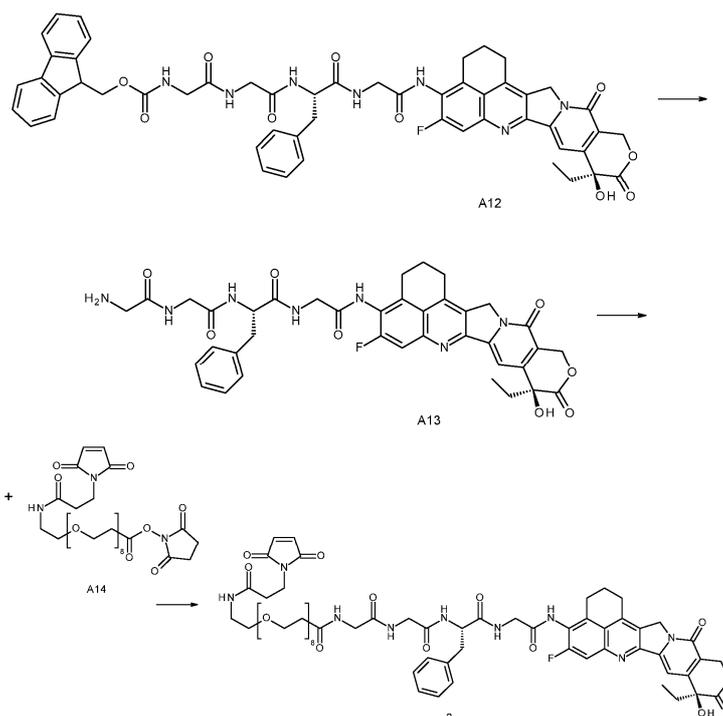
Соединение А5 (150 мг, 0,635 ммоль), 168 мг (0,638 ммоль) (4S)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1H-пирано[3,4-f]индолизин-3,6,10-триона А6 и 168 мг (0,668 ммоль) п-толуолсульфоната пиридиния смешивали в 30 мл безводного толуола. Используя ловушку Дина-Старка реакционную смесь нагревали при 130°C в течение 4 ч. В обратном холодильнике образовывался водяной слой. Растворитель выпаривали и остаток осаждали в 14 мл ацетона, и центрифугировали с получением 180 мг требуемого продукта в виде коричневого твердого вещества. Остаток со стенок колбы смывали ацетоном и собирали с получением 60 мг требуемого продукта в виде коричневого твердого вещества. Объединенный выход неочищенного продукта А7 составлял 82%. LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI $[M+H]=464$; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): сигналы для требуемого продукта, δ ppm 9,77(s, 1H), 7,72(d, $J=11,1$ Гц, 1H), 7,25 (s, 1H), 5,36 (s, 2H), 5,17(s, 2H), 3,09 (t, $J=5,5$ Гц, 2H), 2,91 (t, $J=5,5$ Гц, 2H), 2,22(s, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,96 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 0,81 (t, $J=7,3$ Гц, 3H).

f) (S)-4-Амино-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион 1

60 мг неочищенного соединения А7 растворяли в 0,5 мл HCl (37%), и реакцию проводили в герметичной пробирке в микроволновом реакторе при 100°C в течение 1 ч. Растворитель выпаривали, остаток растворяли в 1 мл NMP и очищали с помощью Rprep-HPLC с 0,1% TFA в воде в качестве растворителя и 0,1% TFA в ацетонитриле в качестве растворителя B. Фракции, содержащие требуемый продукт, собирали и замораживали. После лиофилизации реакционной смеси получали 28 мг (42%) требуемого продукта 1 в виде оранжевого твердого вещества. LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI $[M+H]=422$; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ ppm 7,56 (d, $J=12,4$ Гц, 1H), 7,14 (s, 1H), 5,34 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 2,99 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,78 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 1,95 (t, $J=5,8$ Гц, 2H), 1,79 (m, 2H), 1,40-1,00 (m, 3H), 0,81 (t, $J=7,4$ Гц, 3H).

Пример 2.





а) 5,8-Диамино-6-фтор-1-тетралон А8

Раствор 5-ацетиламино-6-фтор-8-амино-1-тетралона А5 (1,0 г, 4,2 ммоль) в вн. НСl (50 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток медленно добавляли в насыщенный водный раствор NaHO_3 (60 мл). Полученную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (100 мл \times 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (100 мл), высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения А8 (0,7 г, выход 90%) в виде желтого твердого вещества.

(Способ с микроволновой обработкой) 240 мг 5-ацетиламино-6-фтор-8-амино-1-тетралона А5 (1,06 ммоль) растворяли в 3 мл НСl (37%) и вводили в реакцию в микроволновом реакторе при 100°C в течение 1 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток медленно добавляли в насыщенный водный раствор NaHO_3 (10 мл). Полученную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (15 мл \times 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (20 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения А8 (180 мг, выход 87%).

б) 5-Alloc-глицин-8-амино-6-фтор-1-тетралон А9

К раствору соединения А8 (0,7 г, 3,8 ммоль) и Alloc-Gly-OH (0,7 г, 4,2 ммоль) в THF (50 мл) добавляли Et_3N (0,4 г, 4,2 ммоль), HOBT (0,6 г, 4,2 ммоль) и EDCI (0,9 г, 4,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и затем промывали с помощью насыщенного водного раствора NaHO_3 (50 мл) и солевого раствора (50 мл). Органическую фазу высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (DCM/MeOH=200:1) с получением соединения А9 (0,52 г, выход 41%) в виде грязно-белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ ppm 9,15 (s, 1H), 7,53 (t, $J=6,0$ Гц, 1H), 6,41 (d, $J=12,4$ Гц, 1H), 5,92-5,88 (m, 1H), 5,33-5,28 (m, 1H), 5,20-5,17 (m, 1H), 4,51-4,49 (m, 2H), 3,78 (d, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,65 (t, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,55-2,49 (m, 2H), 1,87-1,84 (m, 2H).

с) Аллил-(S)-(2-((9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)карбамат А10

250 мг (0,746 ммоль) соединения А9, 200 мг (0,760 ммоль) (4S)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1H-пирано[3,4-f]индолизин-3,6,10-триона А6 и 200 мг (0,796 ммоль) п-толуолсульфоната пиридиния растворяли в 30 мл безводного толуола. Используя ловушку Дина-Старка реакционную смесь нагревали при 130°C в течение 4 ч. Растворитель выпаривали и остаток осаждали в ацетоне с получением 250 мг требуемого продукта в виде коричневого твердого вещества после центрифугирования и высушивания в вакууме. Остаток со стенок колбы промывали с помощью ацетона и концентрировали с получением 110 мг соединения А10 в виде коричневого твердого вещества. Выход неочищенного продукта составлял 87%. LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI $[\text{M}+\text{H}]^+=563$; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ ppm: сигналы для требуемого продукта, 9,88 (s 1H), 7,83 (d, $J=11$ Гц, 1H), 7,63 (t, $J=6,1$ Гц, 1H), 7,33 (s, 1H), 5,99-5,88 (m, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,32 (dd, $J=6,4$ Гц, 1H), 5,26 (s, 2H), 5,20 (dd, $J=7$ Гц, 1H), 4,53 (d, $J=5,3$ Гц, 2H), 3,93 (d, $J=6$ Гц, 2H), 3,18 (t, $J=5,7$ Гц, 2H), 2,97 (t, $J=5,3$ Гц, 2H), 2,23 (s, 1H), 2,03 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 0,88 (t, $J=7,4$ Гц, 3H).

d) (9H-Флуорен-9-ил)метил (2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамат A12

A11 синтезировали следующим образом.

Fmoc-GGF (500 мг, 0,997 ммоль, синтезированный с помощью синтетического способа с применением стандартного пептидного раствора) и 276 мг (1,50 ммоль) пентафторфенола растворяли в 20 мл NMP. К данной суспензии добавляли 0,33 мл EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииимид) (1,8 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. За ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS.

50 мг (0,089 ммоль) соединения A10, 103 мг (0,0887 ммоль) Pd(PPh₃)₄ и 145 мкл (0,899 ммоль) три-этилсилана растворяли в 2 мл NMP. К смеси добавляли 4 мл (0,2 ммоль) активированного кислотой раствора A11. За ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. Реакционную смесь осаждали с помощью простого эфира (2 флакона по 15 мл) и центрифугировали с получением соединения A12. Твердое вещество высушивали на воздухе и применяли без дополнительной очистки.

e) (S)-2-(2-(2-Аминоацетида)ацетида)-N-(2-(((S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)-3-фенилпропанамид A13

Неочищенное соединение A12 растворяли в 2 мл NMP, добавляли 2 мл 20% 4-метилпиперидина (3,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции реакционную смесь очищали посредством Prep-HPLC с 0,1% TFA в воде в качестве растворителя А и 0,1% TFA в ацетонитриле в качестве растворителя В. Фракции, содержащие требуемый продукт, собирали и замораживали/лиофилизировали с получением 23 мг (35%) соединения A13 в виде желтого твердого вещества.

LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI [M+H]=741; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ ppm 9,74 (s, 1H), 8,51 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,43 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,30 (d, J=8,2 Гц, 1H), 7,91 (br, s, 2H+H⁺), 7,76 (d, J=11 Гц, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,21-7,15 (m, 4 H), 7,14-7,07 (m, 1H), 5,37 (s, 2H), 5,21 (s, 2H), 4,55 (m, 1H), 3,98 (m, 2H), 3,82 (dd, J=16,8, 5,6 Гц, 1H), 3,64 (dd, J=16,8, 5,6 Гц, 1H), 3,48 (m, 2H), 3,11 (t, J=5,6 Гц, 2H), 3,05 (dd, J=13,9, 4,4 Гц, 1H), 2,91 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,73 (dd, J=13,8, 9,9 Гц, 1H), 1,96 (m, 2H), 1,80 (m, J=7,4 Гц, 2H), 0,81 (t, J=7,4 Гц, 3H).

j) 1-(3-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид 2

15 мг (0,020 ммоль) соединения A13 и 15 мг (0,022 ммоль) сложного эфира Mal-PEG8-NHS A14 растворяли в 1 мл NMP и в раствор добавляли 14 мкл (0,10 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. За ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC/MS. После полного израсходования амина реакционную смесь фильтровали и очищали посредством Prep-HPLC с 0,1% TFA в воде в качестве растворителя А и 0,1% TFA в ацетонитриле в качестве растворителя В. Фракции, содержащие требуемый продукт, собирали/замораживали/лиофилизировали с получением 14 мг (53%) требуемого продукта в виде желтого твердого вещества.

LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI [M+H]=1315; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ ppm 9,64 (s, 1H), 8,43 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,12-8,06 (m, 2H), 7,94 (t, J=4,6 Гц, 2H), 7,76 (d, J=11 Гц, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,21-7,15 (m, 4 H), 7,14-7,07 (m, 1H), 6,93 (s, 2H), 5,37 (s, 2H), 5,20 (s, 2H), 4,51-4,46 (m, 1H), 3,95 (m, 2H), 3,72 (d, J=6,0 Гц, 1H), 3,68 (d, J=6,0 Гц, 2H), 3,60 (d, J=5,6 Гц, 2H), 3,44-3,41 (m, перекрывается с пиком для PEG и H₂O), 3,29 (t, J=6,0 Гц, 2H), 3,14-3,00 (m, 5 H), 2,91 (t, J=6,1 Гц, 2H), 2,78 (m, 1H), 2,31 (t, J=6,5 Гц, 2H), 2,26 (t, J=7,2 Гц, 2H), 1,96 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 0,81 (t, J=7,2 Гц, 3H).

Общая информация для примера 3.

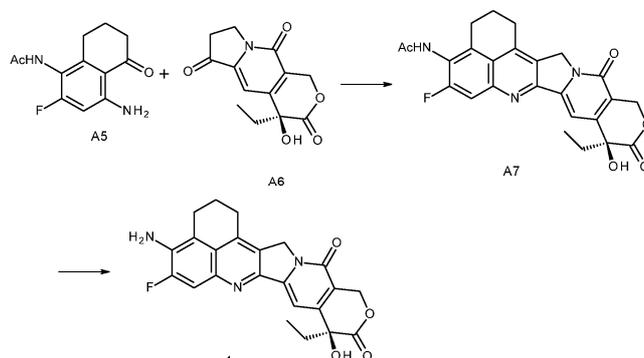
Флэш-хроматографию проводили с применением Biotage® Isolera™ и фракций, проверенных на чистоту с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). TLC проводили с применением силикагеля Merck Kieselgel 60 F254 с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинках. Визуализацию TLC осуществляли с помощью УФ-излучения. Растворители для экстракции и хроматографии приобретали и применяли без дополнительной очистки в VWR U.K. Все химические вещества в чистом виде приобретали в Sigma-Aldrich, если не указано иное. Пегилированные реагенты получали от Quanta biodesign (США) через Stratech (Великобритания).

Аналитические условия LC/MS являлись следующими. Масс-спектрометрию с электрораспылением в режиме детекции положительно заряженных ионов проводили с применением Waters Aquity H-класс SQD2.

Применяемыми подвижными фазами были растворитель А (вода с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты). Прогон градиента в течение 3 мин: исходный состав с 5% В удерживали в течение 25 с, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 1 мин 35 с. Состав удерживали в течение 50 с при 100% В, затем воз-

вращали до 5% В за 5 с и удерживали при данном значении в течение 5 с. Общая продолжительность прогона градиента составляла 3,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Детекцию осуществляли при 254 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм×5 мм.

Пример 3.

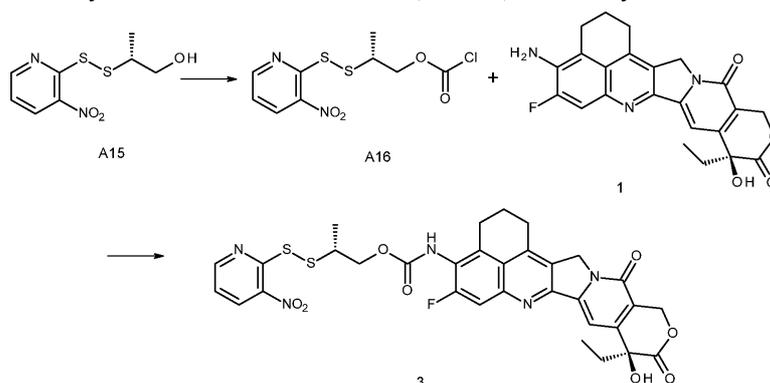


а) Альтернативный вариант синтеза (S)-N-(9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)ацетамида A7

Соединение A5 (136 мг, 0,57569 ммоль) и трион A6 (167 мг, 0,63 ммоль) растворяли в толуоле (20 мл) перед добавлением 4-метилбензолсульфоната пиридин-1-ия (149 мг, 0,59 ммоль) и смесь перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 3,5 ч. LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и растирали с MeCN с получением соединения A7 (220 мг, 0,4746 ммоль, выход 82,45%) в виде бежевого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. Смывы MeCN концентрировали *in vacuo* и очищали посредством хроматографии с применением isolera (0-5% MeOH в CH₂Cl₂) с получением дополнительных 20 мг соединения A7 после очистки с применением isolera (0-5% MeOH в CH₂Cl₂) в виде коричневого твердого вещества. LCMS: RT=1,41 мин, 464,5 [M+H]⁺.

б) Альтернативный вариант синтеза (S)-4-амино-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-диона!

Соединение A7 (220 мг, 0,474 ммоль) растворяли в 5 М HCl_{водн.} (15 мл, 75 ммоль, 5 моль/л) и смесь перемешивали в течение 4 ч при 80°C, сразу после чего LCMS указывал, что весь исходный материал был израсходован. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* с получением соединения 1.2HCl (235 мг, 0,475 ммоль, выход 100,2%) в виде красного твердого вещества. Продукт применяли в виде неочищенного вещества на следующей стадии. LCMS: RT=1,49 мин, масса не указана.



с) Образование *in situ* [(2R)-2-[(2-нитрофенил)дисульфанил]пропил]карбонилхлорида A16

(2R)-2-[(3-Нитро-2-пиридил)дисульфанил]пропан-1-ол A15 (14 мг, 0,057 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (0,5 мл, 8 ммоль). Добавляли пиридин (5,0 мкл, 0,062 ммоль), затем трифосген (6 мг, 0,020 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 30 мин, после чего LCMS (с гашением с помощью Et₂NH) указывала на завершение реакции. LCMS: RT=1,94 мин, 346,4 [M+Et₂NH]⁺

д) (R)-2-((3-Нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропил((S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[de]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбамат 3

В отдельной колбе соединение 1.2HCl (22 мг, 0,044 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (1 мл, 15,60 ммоль, 100 мас.%), DIPEA (45 мкл, 0,258 ммоль) и пиридин (22 мкл, 0,272 ммоль).

Реакционную смесь с хлорформиатом добавляли в раствор анилина и смесь перемешивали в течение 30 мин, после чего LCMS указывала, что хлорформиат был израсходован, при этом присутствия соединения 3 не наблюдали. Добавляли дополнительное количество трифосгена к реакционной смеси и перемешивали в течение 20 мин, после чего LCMS указывала на присутствие небольшого количества продукта. Добавляли дополнительное количество трифосгена и смесь перемешивали в течение 1 ч, после

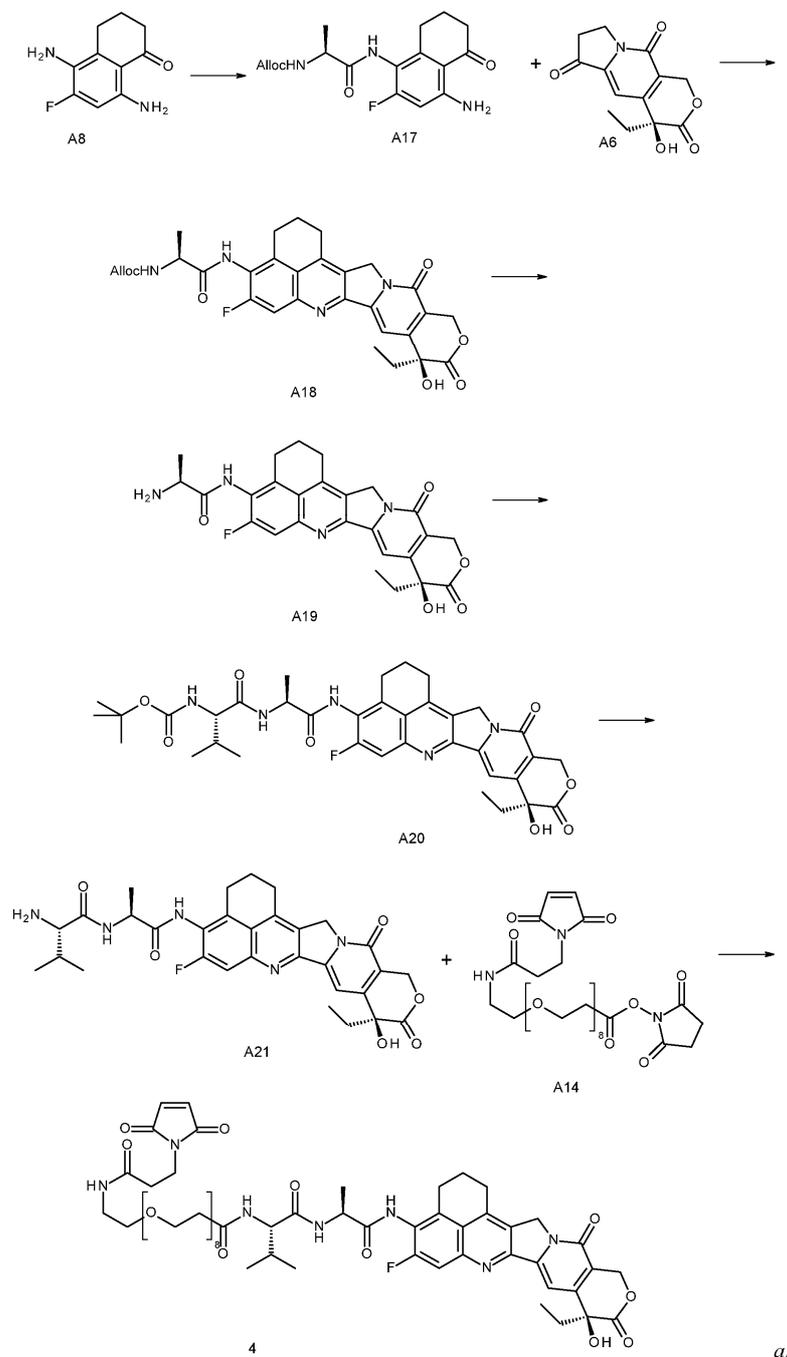
чего LCMS указывала, что соединение 3 было основным компонентом. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и очищали посредством хроматографии с применением isolera (0-4% MeOH в CH₂Cl₂), затем посредством хроматографии с обратной фазой с применением isolera (0-60% элюент В в элюенте А) с получением после сублимационного высушивания чистого соединения 3 (8 мг, 0,01153 ммоль, выход 25,91%) в виде желтого твердого вещества.

Элюент А=0,01% HCO₂H в H₂O

Элюент В=0,01% HCO₂H в MeCN

LCMS: RT=1,95 мин, 694,6 [M+H]⁺.

Пример 4.



а) 5-Фмос-аланин-6-фтор-8-амино-1-тетралон А17

164 мг (0,84 ммоль) 5,8-диамино-6-фтор-1-тетралона А8 растворяли в 6 мл THF и в раствор добавляли 315 мг (1,01 ммоль, 1,2 экв.) Fmoc-Ala-OH и 138 мг HOAt (1,01 ммоль, 1,2 экв.). Затем в раствор добавляли 275 мкл (1,24 ммоль) EDCI и 142 мкл (1,02 ммоль) Et₃N. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. За ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC/MS. Через 4 ч реакционную смесь помещали в морозильную камеру. Реакционную смесь обрабатывали с помощью 50 мл EtOAc/50 мл H₂O с последующим промыванием органического слоя с помощью H₂O, затем солевого раствора и затем высушивали над Na₂SO₄. Неочищенный продукт очищали с помощью колонки с силикаге-

лем с дихлорметаном/метанолом с получением 260 мг требуемого продукта. LCMS ESI [M+H]=488,93; согласно расчетам 488,20

b) A18

210 мг 5-Фмос-аланин-6-фтор-8-амино-1-тетралона A17 (0,43 ммоль), 114 мг триона A6 (0,43 ммоль) и 109 мг п-толуолсульфоната пиридиния (0,43 ммоль) растворяли в 30 мл безводного толуола. Реакционную смесь нагревали на масляной бане, оснащенной ловушкой Дина-Старка, при 130°C в течение 4 ч с получением водного слоя в обратном холодильнике. Раствор декантировали и высушивали при пониженном давлении с получением 270 мг требуемого продукта. Растворитель выпаривали из раствора, и растворяли в 0,5 мл NMP, и осаждали с помощью 14 мл диэтилового эфира. В результате центрифугирования получали коричневое твердое вещество, которое повторно промывали с помощью простого эфира. Полученное твердое вещество высушивали с получением дополнительных 30 мг неочищенного продукта. Все количество неочищенного требуемого продукта (300 мг, выход 97%) применяли без дополнительной очистки. LCMS ESI [M+H]=716,01; согласно расчетам 715,26

c) A19

220 мг (0,31 ммоль) A18 растворяли в 2 мл NMP и в раствор добавляли 150 мкл (1,28 ммоль) 4-метилпиперидина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции реакционную смесь очищали с помощью 0,1% раствора TFA в воде/0,1% раствора TFA в ацетонитриле. Фракции, содержащие требуемый продукт, собирали, объединяли, затем замораживали и получали 42 мг (выход 28%) требуемого продукта после лиофилизации. LCMS ESI [M+H]=493,23; согласно расчетам 493,19

d) A20

23 мг (0,046 ммоль) A19 растворяли в 0,5 мл NMP. В вышеуказанный раствор добавляли 35 мг (0,11 ммоль) Вос-Val-NHS и 20 мкл (0,12 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции продукт осаждали с помощью простого эфира и дважды промывали простым эфиром. Остаток высушивали в атмосфере воздуха с получением 32 мг (выход 99%) коричневого твердого вещества. LCMS ESI [M+H]=693,67; согласно расчетам 692,31

e) A21

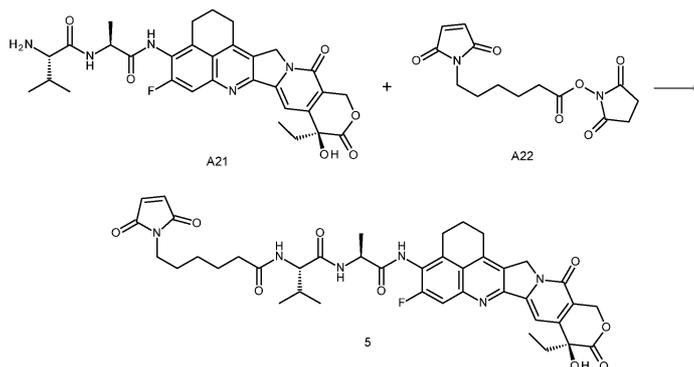
Неочищенное A20 обрабатывали с помощью 0,1 мл TFA в 0,3 мл DCM и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции DCM и трифторуксусную кислоту удаляли в вакууме. Остаток высушивали в вакууме в течение ночи с получением 27 мг (выход 98%) неочищенного продукта. LCMS ESI [M+H]=592,04; согласно расчетам 592,26. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ ppm 10,07 (s, 1H), 8,78 (d, J=6,9 Гц, 1H), 8,10 (d, J=4,1 Гц, 3H), 7,82 (d, J=11,0 Гц, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,53 (s, br, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,67 (q, J=6,7 Гц, 1H), 4,67 (q, J=7,0 Гц, 1H), 3,63 (q, J=5,2 Гц, 1H), 3,17 (t, J=5,9 Гц, 2H), 2,96 (t, J=5,7 Гц, 2H), 2,14-2,07 (m, 1H), 2,05-1,94 (m, 2H), 1,87 (p, J=7,3 Гц, 2H), 1,46 (d, J=7,1 Гц, 3H), 0,96 (dd, J=6,8, 4,2 Гц, 6H), 0,88 (t, J=7,3 Гц, 3H).

f) A14

12 мг (0,017 ммоль) Mal-PEG8-NHS A14 растворяли в 1 мл NMP. В вышеуказанный раствор добавляли 10,3 мг (0,017 ммоль) неочищенного A21 и 12 мкл (0,0094 ммоль) DIPEA. За ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После израсходования исходного материала A21 реакционную смесь подкисляли с помощью 8 мкл TFA, затем очищали с помощью 0,1% раствора TFA в воде/0,1% раствора TFA в ацетонитриле с получением 11 мг требуемого продукта (выход 54%) после лиофилизации. LCMS ESI [M+H]=1166,09; согласно расчетам 1165,52

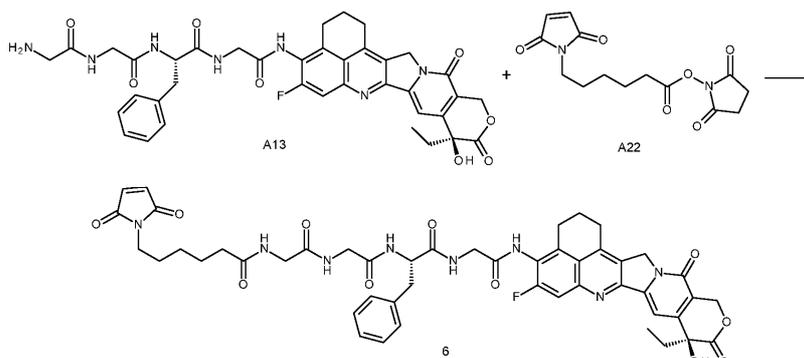
¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ ppm 9,86 (s, 1H), 8,26 (d, J=6,7 Гц, 1H), 8,00 (t, J=5,5 Гц, 1H), 7,90 (d, J=8,7 Гц, 1H), 7,80 (d, J=11 Гц, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 5,43 (s, 2H), 5,26 (s, 2H), 4,54 (q, J=6,7 Гц, 1H), 4,26 (dd, J=8,2, 6,7 Гц, 1H), 3,81-3,48 (m, перекрывается с пиком для H₂O), 3,35 (t, J=6,0 Гц, 2H), 3,20-3,10 (m, 4H), 2,96 (t, 2H), 2,40 (t, J=6,3 Гц, 1H), 2,32 (m, 2H), 2,06-1,93 (m, 3H), 1,93-1,80 (m, 2H), 1,41 (d, J=7,1 Гц, 3H), 0,91-0,80 (m, 9H).

Пример 5.



22 мг (0,037 ммоль) A21 и 14 мг (0,045 ммоль) Mal-капроил-NHS A22 растворяли в 0,5 мл NMP и в данный раствор добавляли 12 мкл (0,068 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции реакционную смесь гасили с помощью 12 мкл трифторуксусной кислоты и очищали посредством rper-HPLC с помощью 0,1% раствора TFA в воде/0,1% раствора TFA в ацетонитриле с получением 10 мг (выход 34%) требуемого продукта после лиофилизации. LCMS ESI [M+H]=785,88; согласно расчетам 785,33. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ ppm 9,86 (s, 1H), 8,23 (d, J=6,7 Гц, 1H), 7,84 (d, J=8,7 Гц, 1H), 7,80 (d, J=11 Гц, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,98 (s, 2H), 6,55-6,50 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,26 (s, 2H), 4,53 (q, J=7,0 Гц, 1H), 4,22 (dd, J=8,7, 6,7 Гц, 1H), 3,16 (t, J=6,0 Гц, 2H), 2,96 (t, 2H), 2,22- 2,07(m, 3H), 2,04-1,94 (m, 3H), 1,93-1,81 (m, 2H), 1,49-1,43 (m, 4 H), 1,40 (d, J=7,1 Гц, 3H), 1,15 (q, J=7,5 Гц, 2H), 0,92-0,82 (m, 9H).

Пример 6.



27 мг A13 (0,0365 ммоль) и 13 мг Mal-капроил-NHS A22 (0,04217 ммоль) растворяли в 0,5 мл NMP и в реакционную смесь добавляли 10 мкл DIPEA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и за ходом протекания реакции наблюдали с помощью LC-MS. После завершения реакции реакционную смесь очищали посредством rper-HPLC с 0,1% TFA/ACN с получением 9 мг (26%) требуемого продукта после лиофилизации. LCMS (0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил) ESI [M+H]=933,29; согласно расчетам 933,36. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ ppm 9,70 (s, 1H), 8,49 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,15 (d, J=8,0 Гц, 1H), 8,05 (t, J=5,7 Гц, 1H), 8,01 (t, J=5,7 Гц, 1H), 7,82 (d, J=11,0 Гц, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,26 (s, 2H), 7,24 (s, 2H), 7,21-7,15 (m, 1H), 6,98 (s, 2H), 6,56 (br, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,26 (s, 2H), 4,58-4,52 (m, 1H), 4,02 (dt, J=16,9, 6,0 Гц, 2H), 3,76 (dd, J=16,7, 5,9 Гц, 1H), 3,65 (d, J=5,7 Гц, 2H), 3,60 (dd, J=16,7, 5,4 Гц, 1H), 3,34 (t, J=7,1 Гц, 2H), 3,17 (t, J=5,7 Гц, 2H), 3,10 (dd, J=13,7, 4,3 Гц, 1H), 2,97 (t, J=5,4 Гц, 2H), 2,84 (dd, J=13,7, 9,7 Гц, 1H), 2,08 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,02 (t, J=5,7 Гц, 2H), 1,87 (dq, J=7,3 Гц, 2H), 1,44 (dt, J=7,3 Гц, 4 H), 1,20-1,12 (m, 2H), 0,88 (t, J=7,3 Гц, 3H).

Пример 7. Конъюгация

Классическая конъюгация

Антитела к HER2, полученные из трастузумаба, и антитела NIP228 в качестве отрицательного контроля применяли в виде полноразмерных антител для получения ADC. Восстановление антител проводили путем смешивания антител с 50 mM трис-(2-карбоксиил)-фосфином (ТСЕР) в 1× PBS, 1 mM EDTA, pH 7,2 при 37°C и реакционную смесь встряхивали в течение 1 ч. Затем восстановленные антитела применяли для конъюгации с применением 5 молярного избытка соединения 2 в диметилсульфоксиде (Sigma-Aldrich). Объем буфера регулировали до достижения 10% конечной концентрации DMSO для раствора для конъюгации. Конъюгацию проводили при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Данный способ использовали для получения:

- конъюгата Her2-2,
- конъюгата Nip228-2,
- конъюгата Her2-4,
- конъюгата Nip228-4,
- конъюгата Her2-5,
- конъюгата Nip228-5,
- конъюгата Her2-6,
- конъюгата Nip228-6.

Конъюгация с конструированием

Антитела, представляющие собой герцептин, и антитела Nip228, сконструированные таким образом, чтобы они содержали цистеин, вставленный между положениями 239 и 240, получали согласно способам, описанным в Dimasi, N., et al., Molecular Pharmaceutics, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 510.1021/acs.molpharmaceut.6b00995). Такие антитела получали с применением 50 mM трис-(2-карбоксиил)-фосфина (ТСЕР) и восстанавливали с помощью 50 mM в PBS 1×, 1 mM EDTA, pH 7,2 при 37°C путем встряхивания в течение 3 ч. Некэпированные антитела подвергали диализу с буфером для конъюгации (PBS 1×, 1 mM EDTA, pH 7,2) при 4°C в течение ночи. Затем восстановленные антитела

применяли для окисления с применением 20 молярного избытка 50 мМ дегидроаскорбиновой кислоты (dhAA) при комнатной температуре со встряхиванием в течение 4 ч. Затем восстановленные антитела применяли для конъюгации с применением 8 молярного избытка полезной нагрузки антитела, полученного в 100% диметилсульфоксиде (конечная концентрация DMSO составляла 10% Sigma-Aldrich). Конъюгацию проводили при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Данный способ использовали для получения

конъюгата Her2*-2,
конъюгата Nip228*-2.

Очистка

После конъюгации ADC очищали посредством HPLC с керамическим гидроксипатитом (СНТ) для удаления соединения 2 в виде свободного основания и других загрязнителей. Очистку проводили с использованием 5 мл колонки Bio-Scale Mini СНТ, тип II, с картриджом 40 мкм (Bio-Rad) и системы АКТА Pure (GE Healthcare). ADC разбавляли в соотношении 1:3 в очищенной воде перед загрузкой. После загрузки и промывания с помощью двух объемов колонки буфера А ADC элюировали с применением линейного градиента 50% буфера В в течение 30 мин. (Буфер А: 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,0; буфер В: 10 мМ фосфат натрия/2 М хлорид натрия, рН 7,0). SEC применяли для определения характеристик фракций, содержащих ADC. Фракции концентрировали до приблизительно 1 мг/мл ADC. SEC применяли для анализа содержания мономеров, агрегатов и фрагментов ADC. Сбор данных и способ проводили с применением программного обеспечения MassHunter (Agilent). ADC фильтровали с применением 0,22 мм шприцевого фильтра (Pall Corporation) для удаления потенциального загрязнения эндотоксинами. Аликвоты ADC хранили при -80°C для дальнейшего использования.

Конъюгат Her2-2 характеризовался DAR, составляющим 8,0, при этом конъюгат Nip228-2 характеризовался DAR, составляющим 7,79.

Конъюгат Her2-4 характеризовался DAR, составляющим 8,0, при этом конъюгат Nip228-4 характеризовался DAR, составляющим 7,88.

Конъюгат Her2-5 характеризовался DAR, составляющим 8,0, при этом конъюгат Nip228-5 характеризовался DAR, составляющим 8,0.

Конъюгат Her2-6 характеризовался DAR, составляющим 7,91, при этом конъюгат Nip228-6 характеризовался DAR, составляющим 8,0.

Конъюгат Her2*-2 характеризовался DAR, составляющим 2,0, и конъюгат Nip228*-2 характеризовался DAR, составляющим 2,0.

Пример 8. Дополнительная конъюгация

10 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕФ) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (40 мол. экв./антитело, 11,2 микромоляр, 1,12 мл) к 20 мл раствора антитела (герцептин, сконструированный таким образом, чтобы он содержал цистеин, вставленный между положениями 239 и 240) (42 мг, 280 наномоль) в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминотetraуксусную кислоту (EDTA), при этом конечная концентрация антитела составляла 2,1 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение 16 ч (или до полного восстановления, определяемого посредством UHPLC) в орбитальном встряхивателе при слабом (60 об/мин) встряхивании. Чтобы удалить весь избыток восстановительного средства с помощью центрифугирования с применением спинного фильтра у восстановленного антитела проводили замену буфера на буфер для повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ EDTA. 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (DHAA, 30 мол. экв./антитело, 7,0 микромоляр, 141 мкл) в DMSO добавляли к 22 мл данного восстановленного антитела, подвергнутого замене буфера (35,2 мг, 235 наномоль), и смесь для повторного окисления оставляли для протекания реакции в течение 2 ч и 30 мин при комнатной температуре и слабом (60 об/мин) встряхивании при концентрации антитела, составляющей 1,6 мг/мл (или добавляли дополнительное количество DHAA и реакционную смесь оставляли на более длительное время до полного повторного окисления цистеиновых тиольных групп с повторным образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидных связей, определяемых посредством UHPLC). Затем смесь для повторного окисления подвергали стерилизующей фильтрации. Соединение 3 добавляли в виде раствора в DMSO (20 мол. экв./антитело, 2,2 микромоляр, в 1,29 мл DMSO) к 10,5 мл данного раствора повторно окисленного антитела (16,8 мг, 112 наномоль), рН регулировали с помощью 1,16 мл 1 М бикарбоната натрия с получением конечной концентрации DMSO, составляющей 10% (об./об.), и 10% (об./об.) конечной концентрации бикарбоната натрия. Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение 2 ч при слабом встряхивании. Затем реакцию конъюгации гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (11 микромоляр, 112 мкл при 100 мМ), затем очищали и проводили замену буфера на буфер с рН 6,0, содержащий 25 мМ гистидина и 205 мМ сахарозы, с применением спинного фильтра Amicon Ultracell 50 кДа MWCO объемом 50 мл, подвергали стерилизующей фильтрации и анализировали. Анализ UHPLC интактного образца конъюгата Her2*-3 с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Sepraх Proteomix HIC бутил-NP5 4,6×35 мм, 5 мкм, при элюировании градиентом буфера с рН 7,4, содержащего 25 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, и 20% ацетонитрила (об./об.) в 25 мМ натрий-фосфатном буфере с рН 7,4, с детекцией при 214 и 330 нм (специфических

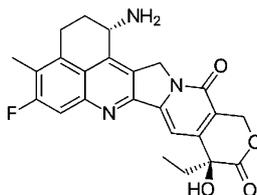
для соединения 3), продемонстрировал наличие неконъюгированного и конъюгированного антитела, присоединенного к одной или двум молекулам соединения 3, что соответствовало соотношению лекарственного средства/антитело (DAR), составляющему 1,48 молекулы соединения 3 на антитело.

Анализ UHPLC образца конъюгата Her2*-3 с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP, 4 мкм, 4,6×150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0×20 мм), при элюировании со скоростью потока 0,3 мл/мин, с помощью простерилизованного фильтрацией буфера для SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), с детекцией при 280 нм, продемонстрировал мономерную чистоту, составляющую 98%. Анализ UHPLC SEC показал, что концентрация конечного конъюгата Her2*-3 составляет 1,38 мг/мл в 8,6 мл, а полученная масса конъюгата Her2*-3 составила 11,9 мг (выход 71%).

Пример 9. Тестирование *in vitro* цитотоксичности тестируемых соединений

Уничтожение клеточных линий опухоли человека оценивали *in vitro* с применением протокола, рекомендуемого в наборе CELLTITER-GLO® (Promega, Мэдисон, Висконсин). Вкратце, 3×10³ клеток в 80 мкл RPMI+10% FBS добавляли во внутренние лунки 96-луночного планшета с белыми стенками (Corning® Costar®, Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Тестировали следующие клеточные линии: A549, HCT116 и SKBR3. Тестируемые соединения разбавляли до 5Ах исходным раствором (125 мкг/мл) в RPMI+10% FBS. Варианты обработки затем серийно разбавляли 1:10 в RPMI+10% FBS. 20 мл этой серии добавляли к клеткам в трех повторностях, что приводило к получению кривой с 9 точками дозы тестируемого соединения, находящейся в диапазоне от 25 мМ в наивысшей концентрации до 2,5×10⁻⁷ мМ в наименьшей. Также включали контроли, представляющие собой DMSO (среда-носитель) и только среду. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. В конце периода инкубирования в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата (Promega, Мэдисон, Висконсин). Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера EnVision Multilabel (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Анализировали данные и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Холья, Калифорния).

Эксатекан:



включали в анализ для сравнения с соединением 1.

IC ₅₀ (нМ)	Эксатекан	Соединение 1
A549	2,449	0,2484
SKBR3	0,181	0,09575
HCT116	0,9956	0,1644

Пример 10. Тестирование *in vitro* цитотоксичности ADC

Для тестирования цитотоксичности ADC *in vitro*, применялся такой же протокол, как и для малых молекул. Для анализа цитотоксичности *in vitro* применяли линии клеток рака молочной железы человека SKBR-3 (ATCC) и NCI-N87 (ATCC), экспрессирующие HER2. Линии клеток рака молочной железы MDA-MB-468 (ATCC), которые не экспрессируют HER2, применяли в качестве отрицательного контроля. Пятикратные последовательные разбавления каждого из ADC (начиная с 300 мкг/мл) добавляли в каждую лунку в трех повторностях. Клетки, обработанные ADC, культивировали в течение шести дней. В конце периода инкубирования в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата (Promega, Мэдисон, Висконсин). Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера EnVision Multilabel (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Анализировали данные и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ла-Холья, Калифорния).

EC ₅₀ (мкг/мл)	Her2-2	NIP228-2	Her2*-2	NIP228*-2
SKBR3	0,0004781	84,91	0,002179	10,06
NCI-N87	0,001003	~ 77610	0,01878	~ 10637
MDA-MB-468	2,849	~ 275569	~ 137570	466,0

Пример 11. Дополнительное тестирование цитотоксичности ADC *in vitro*

Концентрацию и жизнеспособность клеток из субконфлюэнтной культуры (конфлюэнтность 80-90%) в матрице T75 измеряли посредством окрашивания трипановым синим, а подсчет осуществляли с применением автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли до 2×10⁵/мл, распределяли (50 мкл на лунку) в 96-луночные планшеты с плоским дном.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (20 мкг/мл) получали

путем разбавления простерилизованного фильтрацией ADC в среде для культивирования клеток. Набор из 8× 10-кратных разведений исходного раствора ADC получали в 24-луночной планшете путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток. Разведения ADC вносили (из расчета 50 мкл на лунку) в 4 повторные лунки в 96-луночной планшете, содержащие 50 мкл суспензии клеток, высеянных туда ранее. В контрольные лунки вносили по 50 мкл среды для культивирования клеток. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37°C в инкубаторе, насыщаемом CO₂, в течение периода воздействия.

В конце инкубационного периода жизнеспособность клеток измеряли посредством анализа с MTS. MTS (Promega) вносили (из расчета 20 мкл на лунку) в каждую лунку и инкубировали в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе, насыщаемом CO₂. Поглощение в лунках измеряли при 490 нм. Процентную долю выживших клеток рассчитывали на основании среднего поглощения у 4 лунок, обработанных ADC, по сравнению со средним поглощением у 4 контрольных лунок без обработки (100%). IC₅₀ определяли на основании данных доза-ответ с применением GraphPad Prism с помощью нелинейного алгоритма аппроксимации: сигмоидальные кривые доза-ответ с переменным наклоном.

Периоды инкубации с ADC составляли 4 дня в случае MDA-MB-468 и 7 дней в случае NCI-N87. MDA-MB-468 и NCI-N87 культивировали в RPMI 1640 с Glutamax+10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки HyClone™.

EC ₅₀ (мкг/мл)	Her2 ⁺ -3
NCI-N87	0,09328
MDA-MB-468	~0,9772

Пример 12. Исследования в мышинных ксенотрансплантатных моделях (JIMT-1) in vivo

Мыши

В день 1 исследования возраст самок мышей SCID (Fox Chase SCID®, CB17/Icr-Prkdcscid/IcoIcrCtrl, Charles River) составлял десять недель, а масса тела (BW) находилась в диапазоне 17,3-26,3 г. Животным предоставляли ad libitum доступ к воде (обработана с помощью обратного осмоса, 1 ppm Cl) и модифицированному рациону NIH 31 и подвергнутому облучению рациону Lab Diet®, содержащему 18,0% сырого белка, 5,0% сырого жира и 5,0% сырой клетчатки. Мышей размещали на подвергнутой облучению подстилке для лабораторных животных Enrich-o'cobs™ Laboratory Animal Bedding в фиксированных микроизоляторах в условиях 12-часового светового цикла при 20-22°C (68-72°F) и 40-60% влажности. Служба исследований Charles River четко выполняет рекомендации Руководства по уходу за лабораторными животными и их использованию относительно содержания, разведения, проведения хирургических процедур, контроля кормления и выпаивания, а также оказания ветеринарной помощи. Программа по уходу и использованию животных в службе исследований Charles River аккредитована Международной ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC), что обеспечивает соблюдение принятых стандартов по уходу и использованию лабораторных животных.

Культура опухолевых клеток

Клетки рака молочной железы человека JIMT-1 культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 100 единиц/мл натрия пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 25 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамин. Культуры клеток поддерживали в колбах для культур тканей в инкубаторе с увлажнением при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

Имплантация in vivo и рост опухоли

Клетки опухоли JIMT-1, используемые для имплантации, собирали в фазе логарифмического роста и ресуспендировали в 50% Matrigel® Matrix (Corning®) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с концентрацией 1×10⁸ клеток/мл. Каждой подопытной мыши вводили посредством подкожной инъекции в правый бок 1×10⁷ клеток JIMT-1 (0,1 мл суспензии клеток), и рост опухоли отслеживали, когда средний размер приближался к целевому диапазону 150-250 мм³. Опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с применением штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w=ширина и l=длина опухоли в мм. Массу опухоли можно рассчитывать, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли.

Через двадцать один день после имплантации опухоли в день, обозначенный как день 1 исследования, животных с индивидуальными значениями объема опухоли, находящимися в диапазоне от 172-221 мм³, распределяли в девять групп (n=8), при этом медианное значение объема опухоли в группе составляло 199-202 мм³.

Обработка

Обработку начинали в день 1 в девяти группах с самками мышей SCID (n=8) с созданными путем подкожной инъекции ксенотрансплантатами JIMT-1 (172-221 мм³). Каждое тестируемое средство оце-

нивали в дозе 3 мг/кг при внутривенном введении (i.v.) одной инъекции в день 1 (qd×1). Группа с обработкой средой-носителем выполняла роль контроля для приживания и роста опухолей.

Опухоли измеряли дважды в неделю до конца исследования в день 78. Каждую мышь подвергали эвтаназии, когда опухоль достигала объема в конечной точке, составлявшего 1000 мм³, или в последний день исследования, в зависимости от того, что наступало раньше. Для каждой мыши время до конечной точки (TTE) рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$TTE = \frac{\log_{10}(\text{объем в конечной точке}) - b}{m}$$

где TTE выражен в днях, объем в конечной точке выражен в мм³, b представляет собой отрезок, отсекаемый по оси, и m представляет собой наклон линии, полученный на основе линейной регрессии логарифмически преобразованного набора данных о росте опухоли. Результат лечения определяли исходя из процента снижения роста опухоли (%TGD), определяемого, как процентное снижение медианного значения TTE группы обработки по сравнению с контрольной группой мышей, при этом статистически значимыми отличиями между группами считали при $P \leq 0,05$, с применением лог-рангового анализа выживаемости.

Эффективность обработки можно также определять исходя из объемов опухолей у животных, остающихся в исследовании, в последний день. MTV (n) определяли как медианное значение объема опухоли в последний день исследования среди оставшегося количества животных (n), чей объем опухоли не достиг объема в конечной точке.

Эффективность обработки можно также определять исходя из частоты возникновения и величины ответов в виде регрессии, наблюдаемых в ходе исследования. Обработка может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. При ответе в виде PR объем опухоли составлял 50% или менее от ее объема в день 1 в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования, и был равен или превышал 13,5 мм³ в ходе одного или нескольких из этих трех измерений. При ответе в виде CR объем опухоли составлял менее 13,5 мм³ в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования. Животное с ответом в виде CR на момент завершения исследования дополнительно классифицировали как выжившее без опухоли (TFS). Животных контролировали в отношении возникновения ответа в виде регрессии.

Результаты

Все схемы хорошо переносились. Медианное значение TTE для контролей составило 39,4 дня, с установлением максимально возможного TGD, составляющего 38,6 дня (98%) для 78-дневного исследования.

Группа	n	Средство	Медианное значение TTE	T-C	% TGD	Статистическая значимость
1	8	Среда-носитель	39,4	---	---	---
2	8	Her2-2	78,0	38,6	98	***
3	8	Her2-4	78,0	38,6	98	***
4	8	Her2-6	78,0	38,6	98	***
5	8	Her2-5	78,0	38,6	98	***
6	8	NIP228-2	56,9	17,5	44	***
7	8	NIP228-4	49,9	10,5	27	***
8	8	NIP228-6	60,2	20,8	53	***
9	8	NIP228-5	45,9	6,5	16	*

Группа	Средство	MTV (n) День 78	Регрессии			Медианное значение (BW), самый низкий уровень	Летальные исходы	
			PR	CR	TFS		TR	NTR
1	Среда-носитель	---	0	0	0	-1,5%, день 33	0	0
2	Her2-2	255 (8)	3	5	1	-3,7%, день 50	0	0
3	Her2-4	226 (8)	4	4	0	-1,0%, день 4	0	0
4	Her2-6	550 (7)	6	2	0	-5,0%, день 40	0	0
5	Her2-5	365 (8)	3	5	0	-10,4%, день 75	0	0
6	NIP228-2	---	0	0	0	-0,6%, день 5	0	0
7	NIP228-4	---	1	0	0	-3,0%, день 43	0	0
8	NIP228-6	---	1	0	0	-1,0%, день 4	0	0
9	NIP228-5	---	0	0	0	-4,8%, день 43	0	0

Четыре трастузамаб-ADC, обеспечивали максимальное значение TGD, составляющее 98%, при этом каждый демонстрировал как частичные, так и полные регрессии.

Пример 12. Исследования в мышинных ксенотрансплантатных моделях (NCI-N87) *in vivo*
Мыши:

В день 1 исследования возраст самок мышей SCID (Fox Chase SCID®, CB17/Icr-Prkdescid/IcoIcrCtrl, Charles River) составлял двенадцать недель, а масса тела (BW) находилась в диапазоне 15,9-26,4 г. Животным предоставляли *ad libitum* доступ к воде (обработана с помощью обратного осмоса, 1 ppm Cl) и модифицированному рациону NIH 31 и подвергнутому облучению рациону Lab Diet®, содержащему 18,0% сырого белка, 5,0% сырого жира и 5,0% сырой клетчатки. Мышей размещали на подвергнутой облучению подстилке для лабораторных животных Enrich-o-cobs™ Laboratory Animal Bedding в фиксированных микроизоляторах в условиях 12-часового светового цикла при 20-22°C (68-72°F) и 40-60% влажности. Служба исследований CR четко выполняет рекомендации Руководства по уходу за лабораторными животными и их использованию относительно содержания, разведения, проведения хирургических процедур, контроля кормления и выпаивания, а также оказания ветеринарной помощи.

Программа по уходу и использованию животных в службе исследований CR аккредитована Международной ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC), что обеспечивает соблюдение принятых стандартов по уходу и использованию лабораторных животных.

Культура опухолевых клеток

Клетки NCI-N87 карциномы желудка человека культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ глутамина, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки выращивали в матрасах для культур тканей в инкубаторе с увлажнением при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

Имплантация *in vivo* и рост опухоли

Клетки опухоли NCI-N87, используемые для имплантации, собирали в фазе логарифмического роста и ресуспендировали в 50% Matrigel® Matrix (Corning®) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при концентрации 1×10⁸ клеток/мл. Каждой подопытной мыши вводили посредством подкожной инъекции в правый бок 1×10⁷ клеток NCI-N87 (0,1 мл суспензии клеток), и рост опухоли отслеживали, когда средний размер приближался к целевому диапазону 150-250 мм³. Опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с применением штангенциркуля и объем рассчитывали по формуле:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w - ширина и l - длина опухоли в мм. Массу опухоли можно рассчитывать, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли.

Через сорок дней после имплантации опухоли в день, обозначенный как день 1 исследования, животных с индивидуальными значениями объема опухоли, находящимися в диапазоне от 144-256 мм³, распределяли в девять групп (n=8), при этом медианное значение объема опухоли в группе составляло 190-192 мм³.

Обработка

Обработку начинали в день 1 в девяти группах с самками мышей SCID (n=8) с созданными путем подкожной инъекции ксенотрансплантатами NCI-N87 (190-192 мм³). Каждое тестируемое средство оценивали в дозе 3 мг/кг при внутривенном введении (*i.v.*) одной инъекции в день 1 (qd×1). Группа с обработкой средой-носителем выполняла роль контроля для приживания и роста опухолей.

Опухоли измеряли дважды в неделю до конца исследования в день 59. Каждую мышь подвергали

эвтаназии, когда опухоль достигала объема в конечной точке, составлявшего 800 мм³, или в последний день исследования, в зависимости от того, что наступало раньше. Прогрессирование опухоли было медленным, и все подвергавшиеся оценке животные оставались в исследовании в последний день исследования. Ввиду того, что ни у одного животного размер опухоли не достиг объема в конечной точке, то для оценки эффективности использовали процент подавления роста (% TGI) опухоли в последний день исследования. MTV (n), медианное значение объема опухоли, для количества животных, n, в последний день (день 59), определяли для каждой группы для вычисления общего объема опухоли. % TGI определяли как разницу между MTV у обозначенной контрольной группы (группа 1) и MTV у группы, получающей лекарственное средство, выраженную в процентах MTV контрольной группы:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (\text{MTV}_{\text{обработка лекарственным средством}} / \text{MTV}_{\text{контроль}})] \times 100$$

Эффективность обработки можно также определять исходя из объемов опухолей у животных, остающихся в исследовании, в последний день и исходя из частоты возникновения и величины ответов в виде регрессии. MTV (n) определяли как медианное значение объема опухоли в последний день (день 59) среди оставшегося количества подвергавшихся оценке животных, n.

Обработка может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. При ответе в виде PR объем опухоли составлял 50% или меньше от ее объема в день 1 в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования, и был равен или превышал 13,5 мм³ в ходе одного или нескольких из этих трех измерений. При ответе в виде CR объем опухоли составлял менее 13,5 мм³ в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования. Животных оценивали в отношении события PR или CR только один раз в ходе исследования, и оценивали только как CR, если удовлетворились критерии как PR, так и CR.

Результаты

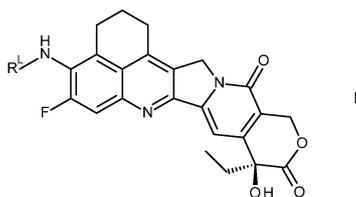
Все схемы приемлемо переносились. Опухоли в контролях характеризовались медленным, прогрессирующим ростом, но не достигали конечной точки анализа, составляющей 800 мм³ на момент завершения исследования. Величину подавления роста опухоли оценивали в последний день исследования (день 59).

Группа	n	Средство	MTV (n) День 59	% TGI	Статистическая значимость	
					PR	CR
1	8	Среда-носитель	550 (8)	---	---	
2	8	Her2-2	3 (8)	99	***	
3	8	Her2-4	1 (8)	100	***	
4	8	Her2-6	5 (8)	99	***	
5	8	Her2-5	4 (8)	99	***	
6	8	NIP228-2	446 (8)	19	ns	
7	8	NIP228-4	405 (8)	26	ns	
8	8	NIP228-6	493 (8)	10	ns	
9	8	NIP228-5	466 (8)	15	ns	
Группа	Средство	Регрессии		Среднее значение	Летальные	
		PR	CR		TR	NTR
1	Среда-носитель	0	0	-7,0%, день 52	0	0
2	Her2-2	1	7	-10,1%, день 52	0	0
3	Her2-4	0	8	-10,3%, день 56	0	0
4	Her2-6	2	6	-10,6%, день 56	0	0
5	Her2-5	0	8	-7,6%, день 59	0	0
6	NIP228-2	0	0	-9,3%, день 56	0	0
7	NIP228-4	0	0	-10,0%, день 59	0	0
8	NIP228-6	0	0	-6,4%, день 59	0	0
9	NIP228-5	0	0	-5,8%, день 59	0	0

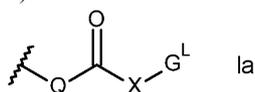
Все группы с обработкой трастузумаб-ADC характеризовались статистически значимым TGI в день 59, по сравнению с группой с обработкой средой-носителем (P < 0,001).

Изложение сущности изобретения

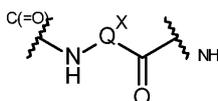
1. Соединение формулы I



и его соли и сольваты, где R^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд, которое выбрано из (ia):

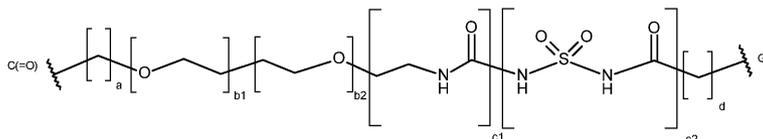


где Q представляет собой



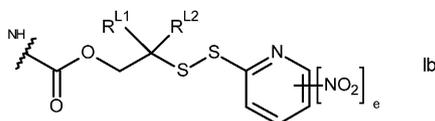
где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0 и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0; G^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

2. Соединение по п.1, где R^L представлен формулой Ia.

3. Соединение по п.2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

4. Соединение по п.3, где Q выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

5. Соединение по п.2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

6. Соединение по п.5, где Q выбран из

NH -Phe-Lys- $C=O$,

NH -Val-Ala- $C=O$,

NH -Val-Lys- $C=O$,

NH -Ala-Lys- $C=O$,

NH -Val-Cit- $C=O$,

NH -Phe-Cit- $C=O$,

NH -Leu-Cit- $C=O$,

NH -Ile-Cit- $C=O$,

NH -Phe-Arg- $C=O$,

NH -Trp-Cit- $C=O$ и

NH -Gly-Val- $C=O$.

7. Соединение по п.6, где Q выбран из

NH -Phe-Lys- $C=O$,

NH -Val-Cit- $C=O$ и

NH -Val-Ala- $C=O$.

8. Соединение по п.2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

9. Соединение по п.8, где Q выбран из
 $\text{NH-Glu-Val-Ala}^{\text{C=O}}$,
 $\text{NH-Glu-Val-Cit}^{\text{C=O}}$,
 $\text{NH-}\alpha\text{Glu-Val-Ala}^{\text{C=O}}$ и
 $\text{NH-}\alpha\text{Glu-Val-Cit}^{\text{C=O}}$.
10. Соединение по п.2, где Q представляет собой тетрапептидный остаток.
11. Соединение по п.10, где Q выбран из
 $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$ и
 $\text{NH-Gly-Phe-Gly-Gly}^{\text{C=O}}$.
12. Соединение по п.11, где Q представляет собой $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$
13. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0-3.
14. Соединение по п.13, где a равняется 0 или 1.
15. Соединение по п.13, где a равняется 0.
16. Соединение по любому из пп.2-15, где b1 равняется 0-8.
17. Соединение по п.16, где b1 равняется 0.
18. Соединение по п.16, где b1 равняется 2.
19. Соединение по п.16, где b1 равняется 3.
20. Соединение по п.16, где b1 равняется 4.
21. Соединение по п.16, где b1 равняется 5.
22. Соединение по п.16, где b1 равняется 8.
23. Соединение по любому из пп.2-15 и 17, где b2 равняется 0-8.
24. Соединение по п.23, где b2 равняется 0.
25. Соединение по п.23, где b2 равняется 2.
26. Соединение по п.23, где b2 равняется 3.
27. Соединение по п.23, где b2 равняется 4.
28. Соединение по п.23, где b2 равняется 5.
29. Соединение по п.23, где b2 равняется 8.
30. Соединение по любому из пп.2-29, где c1 равняется 0.
31. Соединение по любому из пп.2-29, где c1 равняется 1.
32. Соединение по любому из пп.2-31, где c2 равняется 0.
33. Соединение по любому из пп.2-30, где c2 равняется 1.
34. Соединение по любому из пп.2-33, где d равняется 0-3.
35. Соединение по п.34, где d равняется 1 или 2.
36. Соединение по п.34, где d равняется 2.
37. Соединение по любому из пп.2-33, где d равняется 5.
38. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, и d равняется 2, и b2 равняется 0-8.
39. Соединение по п.38, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
40. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, d равняется 0 и b1 равняется 0-8.
41. Соединение по п.40, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
42. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, d равняется 1 и b2 равняется 0-8.
43. Соединение по п.42, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
44. Соединение по любому из пп.2-12, где b1 равняется 0, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, один из a и d равняется 0 и другой из a и d равняется 1-5.
45. Соединение по п.41, где другой из a и d равняется 1 или 5.
46. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2 и b1 равняется 0-8.
47. Соединение по п.46, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
48. Соединение по любому из пп.2-47, где G^L выбран из

(G ^{L1-1})		(G ^{L6})	
(G ^{L1-2})		(G ^{L7})	
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-1})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L9})	
(G ^{L3-2})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L10})	
(G ^{L3-3})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 где Hal представляет собой I, Br, Cl	(G ^{L13})	
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

49. Соединение по п.48, где G^L выбран из GL^{L1-1} и GL^{L1-2}.

50. Соединение по п.48, где G^L представляет собой G^{L1-1}.

51. Соединение по п.1, где R^L представлен формулой Ib.

52. Соединение по п.51, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой H.

53. Соединение по п.51, где R^{L1} представляет собой H и R^{L2} представляет собой метил.

54. Соединение по п.51, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой метил.

55. Соединение по п.51, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют

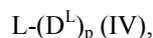
циклопропиленовую группу.

56. Соединение по п.51, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

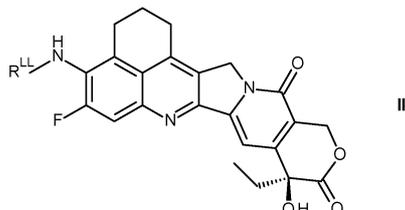
57. Соединение по любому из пп.51-56, где e равняется 0.

58. Соединение по любому из пп.51-56, где e равняется 1.

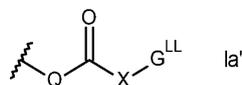
59. Конъюгат формулы IV



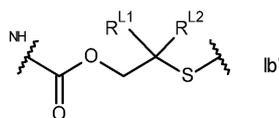
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D^L представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia')



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1-47, и G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в любом из пп.1 и 52-56; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

60. Конъюгат по п.59, где G^{LL} выбран из

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL11})	
(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

61. Конъюгат по п.60, где G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}.

62. Конъюгат по п.61, где G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

63. Конъюгат по любому из пп.59-62, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой средство, связывающееся с клеткой.

64. Конъюгат по любому из пп.59-62, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой антитело или его активный фрагмент.

65. Конъюгат по п.64, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

66. Конъюгат по п.65, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(89):

- (1) VMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;

- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA-TNFRSF17;
- (52) CTA_g - CTA;
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78-HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1-SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56-NCMA1;
- (65) CanAg;

- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1-HAVCR1;
- (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
- (70) B7-H4-VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138-SDC1;
- (74) CD74;
- (75) клаудины - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON-MST1R;
- (79) EPHA2;
- (80) CD20-MS4A1;
- (81) тенасцин С - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1-SLAMF7;
- (86) эндоглин - ENG;
- (87) аннексии А1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
- (89) ASCT2 (SLC1A5).

67. Конъюгат по любому из пп.64-66, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

68. Конъюгат по любому из пп.64-61, где нагрузка лекарственным средством (р) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

69. Конъюгат по п.62, где р равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

70. Смесь конъюгатов по любому из пп.64-63, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело в смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

71. Конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 для применения в терапии.

72. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 и фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

73. Конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 или фармацевтическая композиция по п.66 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

74. Конъюгат, смесь или фармацевтическая композиция по п.73, где заболевание представляет собой рак.

75. Применение конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 или фармацевтической композиции по п.72 в способе консервативного лечения.

76. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.72.

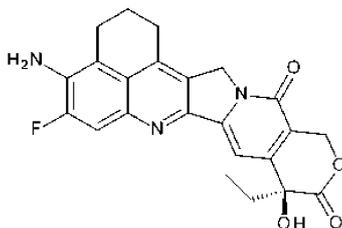
77. Способ по п.76, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

78. Способ по п.77, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

79. Применение конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

80. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включающий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 или фармацевтической композиции по п.72.

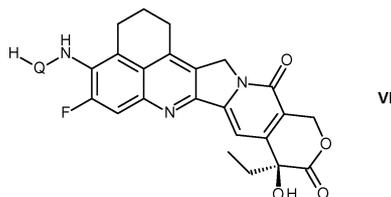
81. Соединение А:



A

82. Соединение по п.81 в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

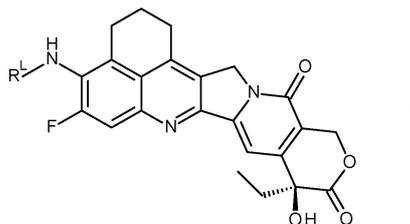
83. Соединение формулы VI



где Q является таким, как описано в любом из пп.1, 3 и 12.

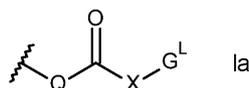
Изложение сущности изобретения из 1-й заявки, на основании которой испрашивается приоритет (P1)

P1-1. Соединение формулы I:

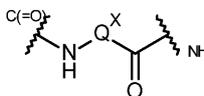


и его соли и сольваты, где R^L представляет собой линкер для присоединения к средству, связывающемуся с клеткой, который выбран из:

(ia):

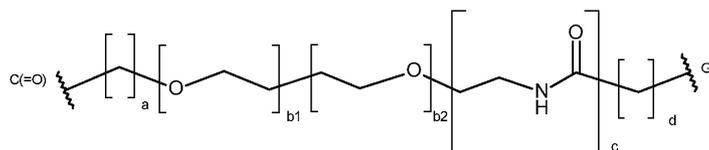


где Q представляет собой



где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

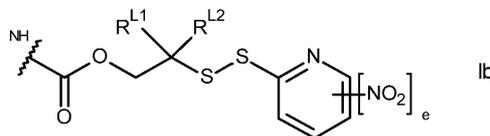
X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0;

G^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу и e равняется 0 или 1.

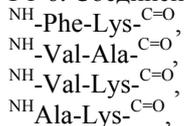
P1-2. Соединение по п. P1-1, где R^L представлен формулой Ia.

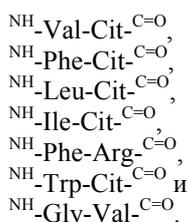
P1-3. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

P1-4. Соединение по п. P1-3, где Q выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

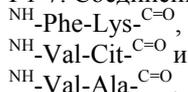
P1-5. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

P1-6. Соединение по п. P1-5, где Q выбран из



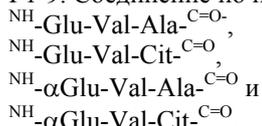


P1-7. Соединение по п. P1-6, где Q выбран из



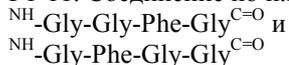
P1-8. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

P1-9. Соединение по п. P1-8, где Q выбран из



P1-10. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой тетрапептидный остаток.

P1-11. Соединение по п. P1-10, где Q выбран из



P1-12. Соединение по п. P1-11, где Q представляет собой $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$.

P1-13. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-12, где a равняется 0-3.

P1-14. Соединение по п. P1-13, где a равняется 0 или 1.

P1-15. Соединение по п. P1-13, где a равняется 0.

P1-16. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-15, где b1 равняется 0-8.

P1-17. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 0.

P1-18. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 2.

P1-19. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 3.

P1-20. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 4.

P1-21. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 5.

P1-22. Соединение по п. P1-16, где b1 равняется 8.

P1-23. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-15 и P1-17, где b2 равняется 0-8.

P1-24. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 0.

P1-25. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 2.

P1-26. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 3.

P1-27. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 4.

P1-28. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 5.

P1-29. Соединение по п. P1-23, где b2 равняется 8.

P1-30. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-29, где c равняется 0.

P1-31. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-29, где c равняется 1.

P1-32. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-31, где d равняется 0-3.

P1-33. Соединение по п. P1-32, где d равняется 1 или 2.

P1-34. Соединение по п. P1-32, где d равняется 2.

P1-35. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 1, d равняется 2 и b2 равняется 0-8.

P1-36. Соединение по п. P1-35, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P1-37. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c равняется 0, d равняется 0 и b1 равняется 0-8.

P1-38. Соединение по п. P1-37, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P1-39. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 0, d равняется 1 и b2 равняется 0-8.

P1-40. Соединение по п. P1-39, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P1-41. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-12, где b1 равняется 0, b2 равняется 0, c равняется 0, один из a и d равняется 0 и другой из a и d равняется 1-5.

P1-42. Соединение по п. P1-41, где другой из a и d равняется 1 или 5.

P1-43. Соединение по любому из пунктов с P1-2 по P1-42, где G^L выбран из

(G ^{L1-1})		(G ^{L6})	
(G ^{L1-2})		(G ^{L7})	
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-1})		(G ^{L9})	
	где группа NO ₂ является необязательной		
(G ^{L3-2})		(G ^{L10})	
	где группа NO ₂ является необязательной		
(G ^{L3-3})		(G ^{L11})	
	где группа NO ₂ является необязательной		
(G ^{L3-4})		(G ^{L12})	
	где группа NO ₂ является необязательной		
(G ^{L4})		(G ^{L13})	
	где Hal представляет собой I, Br, Cl		
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

P1-44. Соединение по п. P1-43, где G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}.

P1-45. Соединение по п. P1-43, где G^L представляет собой G^{L1-1}.

P1-46. Соединение по п. P1-1, где R^L представлен формулой Ib.

P1-47. Соединение по п. 4 P1-6, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой H.

P1-48. Соединение по п. P1-46, где R^{L1} представляет собой H и R^{L2} представляет собой метил.

P1-49. Соединение по п. P1-46, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой метил.

P1-50. Соединение по п. P1-46, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

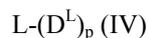
P1-51. Соединение по п. P1-46, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, об-

разуют циклобутиленовую группу.

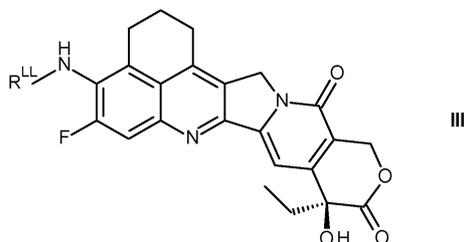
P1-52. Соединение по любому из пунктов с v46 по P1-51, где e равняется 0.

P1-53. Соединение по любому из пунктов с P1-46 по P1-51, где e равняется 1.

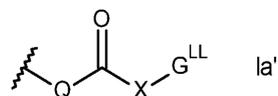
P1-54. Конъюгат формулы IV



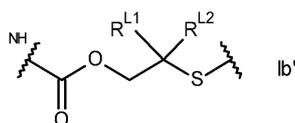
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D^L представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia'):

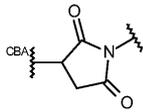
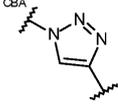
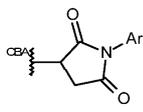
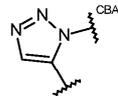
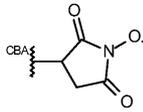
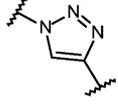
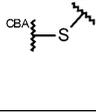
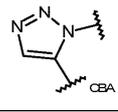
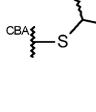
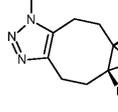
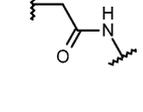
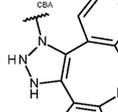
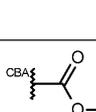
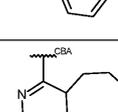
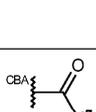
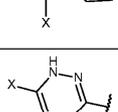
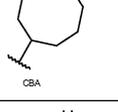


где Q и X являются такими, как определено в любом из пунктов с P1-1 по P1-42, и G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в любом из пп. P1-1 и с P1-47 по P1-51; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

P1-55. Конъюгат по п. P1-54, где G^{LL} выбран из

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL11})	
(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

P1-56. Конъюгат по п. P1-55, где G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}.

P1-57. Конъюгат по п. P1-56, где G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

P1-58. Конъюгат по любому из пунктов с P1-54 по P1-57, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой антитело или его активный фрагмент.

P1-59. Конъюгат по п. P1-58, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

P1-60. Конъюгат по п. P1-59, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(89):

- (1) VMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;

- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA-TNFRSF17;
- (52) CT Ag - CTA;
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78-HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1-SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56-NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;

- (68) TIM-1-HAVCR1;
 (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
 (70) B7-H4-VTCN1;
 (71) PTK7;
 (72) CD37;
 (73) CD138-SDC1;
 (74) CD74;
 (75) клаудины - CL;
 (76) EGFR;
 (77) Her3;
 (78) RON-MST1R;
 (79) EPHA2;
 (80) CD20-MS4A1;
 (81) тенацин С - TNC;
 (82) FAP;
 (83) DKK-1;
 (84) CD52;
 (85) CS1 -SLAMF7;
 (86) эндоглин - ENG;
 (87) аннексии A1 - ANXA1;
 (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
 (89) ASCT2 (SLC1A5).

P1-61. Конъюгат по любому из пунктов с P1-58 по P1-60, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

P1-62. Конъюгат по любому из пунктов с P1-58 по P1-61, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

P1-63. Конъюгат по п.P1-62, где p равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

P1-64. Смесь конъюгатов по любому из пунктов с P1-58 по P1-63, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело в смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

P1-65. Конъюгат или смесь по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 для применения в терапии.

P1-66. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

P1-67. Конъюгат или смесь по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 или фармацевтическая композиция по п.P1-66 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

P1-68. Конъюгат, смесь или фармацевтическая композиция по п.P1-67, где заболевание представляет собой рак.

P1-69. Применение конъюгата или смеси по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 или фармацевтической композиции по п.P1-66 в способе консервативного лечения.

P1-70. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.P1-66.

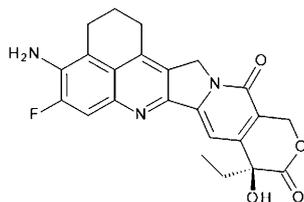
P1-71. Способ по п.P1-70, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

P1-72. Способ по п.P1-71, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

P1-73. Применение конъюгата или смеси по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

P1-74. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включающий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пунктов с P1-54 по P1-64 или фармацевтической композиции по п.P1-66.

P1-75. Соединение А

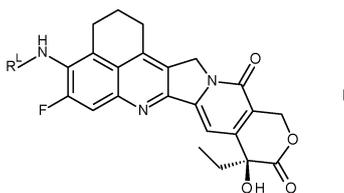


А

P1-76. Соединение по п.P1-75 в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

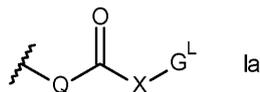
Изложение сущности изобретения из 2-й заявки, на основании которой испрашивается приоритет (P2)

P2-1. Соединение формулы I

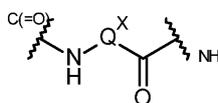


и его соли и сольваты, где R^L представляет собой линкер для присоединения к средству, связывающемуся с клеткой, который выбран из:

(ia)

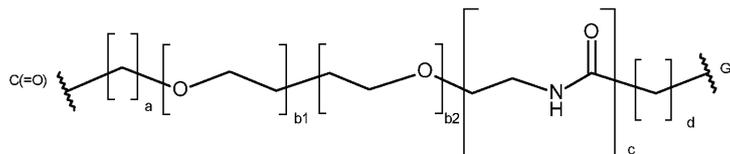


где Q представляет собой



где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

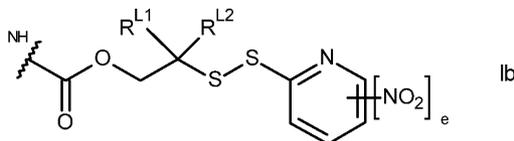
X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0;

G^L представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

P2-2. Соединение по п. P2-1, где R^L представлен формулой Ia.

P2-3. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

P2-4. Соединение по п. P2-3, где Q выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

P2-5. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

P2-6. Соединение по п. P2-5, где Q выбран из

$NH-Phe-Lys-C=O$,

$NH-Val-Ala-C=O$,

$NH-Val-Lys-C=O$,

$NH-Ala-Lys-C=O$,

$NH-Val-Cit-C=O$,

$NH-Phe-Cit-C=O$,

$NH-Leu-Cit-C=O$,

$NH-Ile-Cit-C=O$,

$NH-Phe-Arg-C=O$,

$NH-Trp-Cit-C=O$ и

$NH-Gly-Val-C=O$.

P2-7. Соединение по п. P2-6, где Q выбран из

$NH-Phe-Lys-C=O$,

NH-Val-Cit-C=O и

NH-Val-Ala-C=O .

P2-8. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

P2-9. Соединение по п. P2-8, где Q выбран из

$\text{NH-Glu-Val-Ala-C=O}$,

$\text{NH-Glu-Val-Cit-C=O}$,

$\text{NH-}\alpha\text{Glu-Val-Ala-C=O}$ и

$\text{NH-}\alpha\text{Glu-Val-Cit-C=O}$.

P2-10. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой тетрапептидный остаток.

P2-11. Соединение по п. P2-10, где Q выбран из

$\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly-C=O}$ и

$\text{NH-Gly-Phe-Gly-Gly-C=O}$.

P2-12. Соединение по п. P2-11, где Q представляет собой

$\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly-C=O}$.

P2-13. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-12, где a равняется 0-3.

P2-14. Соединение по п. P2-13, где a равняется 0 или 1.

P2-15. Соединение по п. P2-13, где a равняется 0.

P2-16. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-15, где b1 равняется 0-8.

P2-17. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 0.

P2-18. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 2.

P2-19. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 3.

P2-20. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 4.

P2-21. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 5.

P2-22. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 8.

P2-23. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-15 и P2-17, где b2 равняется 0-8.

P2-24. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 0.

P2-25. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 2.

P2-26. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 3.

P2-27. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 4.

P2-28. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 5.

P2-29. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 8.

P2-30. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-29, где c равняется 0.

P2-31. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-29, где c равняется 1.

P2-32. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-31, где d равняется 0-3.

P2-33. Соединение по п. P2-32, где d равняется 1 или 2.

P2-34. Соединение по п. P2-32, где d равняется 2.

P2-35. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 1, d равняется 2 и b2 равняется 0-8.

P2-36. Соединение по п. P2-35, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P2-37. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c равняется 0, d равняется 0 и b1 равняется 0-8.

P2-38. Соединение по п. P2-37, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P2-39. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 0, и d равняется 1, и b2 равняется 0-8.

P2-40. Соединение по п. P2-39, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

P2-41. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-12, где b1 равняется 0, b2 равняется 0, c равняется 0, один из a и d равняется 0 и другой из a и d равняется 1-5.

P2-42. Соединение по п. P2-41, где другой из a и d равняется 1 или 5.

P2-43. Соединение по любому из пунктов с P2-2 по P2-42, где G^L выбран из

(G ^{L1-1})		(G ^{L6})	
(G ^{L1-2})		(G ^{L7})	
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-1})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L9})	
(G ^{L3-2})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L10})	
(G ^{L3-3})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 где Hal представляет собой I, Br, Cl	(G ^{L13})	
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

P2-44. Соединение по п. P2-43, где G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}.

P2-45. Соединение по п. P2-43, где G^L представляет собой G^{L1-1}.

P2-46. Соединение по п. P2-1, где R^L представлен формулой Ib.

P2-47. Соединение по п. P2-46, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой H.

P2-48. Соединение по п. P2-46, где R^{L1} представляет собой H, и R^{L2} представляет собой метил.

P2-49. Соединение по п. P2-46, где R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой метил.

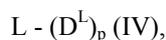
P2-50. Соединение по п. P2-46, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

P2-51. Соединение по п. P2-46, где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

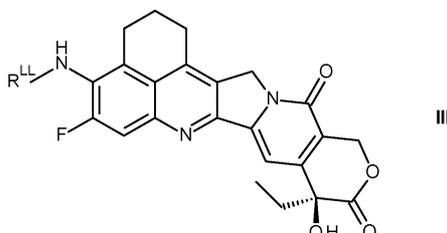
P2-52. Соединение по любому из пунктов с P2-46 по P2-51, где e равняется 0.

P2-53. Соединение по любому из пунктов с P2-46 по P2-51, где e равняется 1.

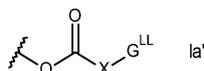
P2-54. Конъюгат формулы IV



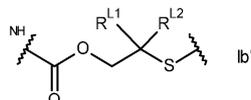
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D^L представляет собой звено лекарственного средство-линкер, представленное формулой III



R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia')



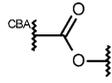
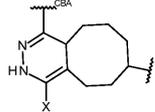
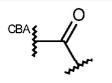
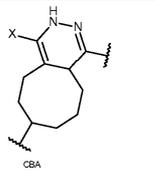
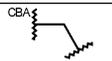
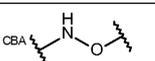
где Q и X являются такими, как определено в любом из пунктов с P2-1 по P2-42, и G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib')



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в любом из пп. P2-1 и с P2-47 по P2-51; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

P2-55. Конъюгат по п. P2-54, где G^{LL} выбран из

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	
(G^{LL4})		(G^{LL11})	

(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

где Ag представляет собой C₅₋₆ариленовую группу и X представляет собой C₁₋₄алкил.

P2-56. Конъюгат по п. P2-55, где G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}.

P2-57. Конъюгат по п. P2-56, где G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

P2-58. Конъюгат по любому из пунктов с P2-54 по P2-57, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой антитело или его активный фрагмент.

P2-59. Конъюгат по п. P2-58, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

P2-60. Конъюгат по п. P2-59, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(89):

- (1) VMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;

- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA-TNFRSF17;
- (52) CT Ag - CTA;
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78-HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1-SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56-NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1-HAVCR1;
- (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
- (70) B7-H4-VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138-SDC1;
- (74) CD74;
- (75) клаудины - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON-MST1R;
- (79) EPHA2;
- (80) CD20-MS4A1;
- (81) тенасцин C - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1 -SLAMF7;
- (86) эндоглин - ENG;
- (87) аннексии A1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
- (89) ASCT2 (SLC1A5).

P2-61. Конъюгат по любому из пунктов с P2-58 по P2-60, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

P2-62. Конъюгат по любому из пунктов с P2-58 по P2-61, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

P2-63. Конъюгат по п. P2-62, где p равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

P2-64. Смесь конъюгатов по любому из пунктов с P2-58 по P2-63, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело в смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

P2-65. Конъюгат или смесь по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 для применения в терапии.

P2-66. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

P2-67. Конъюгат или смесь по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 или фармацевтическая композиция по п. P2-66 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

P2-68. Конъюгат, смесь или фармацевтическая композиция по п. P2-67, где заболевание представляет собой рак.

P2-69. Применение конъюгата или смеси по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 или фармацевтической композиции по п. P2-66 в способе консервативного лечения.

P2-70. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. P2-66.

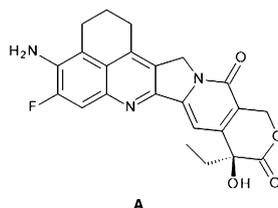
P2-71. Способ по п. P2-70, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

P2-72. Способ по п. P2-71, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

P2-73. Применение конъюгата или смеси по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

P2-74. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включающий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пунктов с P2-54 по P2-64 или фармацевтической композиции по п. 66.

P2-75. Соединение А

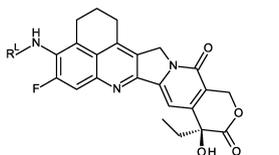


A

P2-76. Соединение по п. P2-75 в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

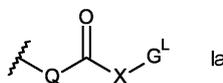
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I



и его соли, где R^L представляет собой линкер для присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту антитела, который выбран из:

(ia):



где Q представляет собой:

(a) аминокислотный остаток, выбранный из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp; или

(b) дипептидный остаток, выбранный из

NH-Phe-Lys-C=O,

NH-Val-Ala-C=O,

NH-Val-Lys-C=O,

NH-Ala-Lys-C=O,

NH-Val-Cit-C=O,

NH-Phe-Cit-C=O,

NH-Leu-Cit-C=O,

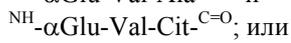
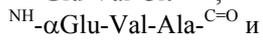
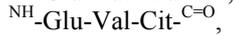
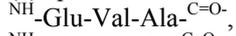
NH-Ile-Cit-C=O,

NH-Phe-Arg-C=O,

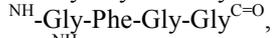
NH-Trp-Cit-C=O и

NH-Gly-Val-C=O или

(с) трипептидный остаток, выбранный из

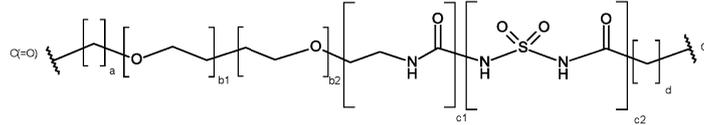


(d) тетрапептидный остаток, выбранный из



где NH^{H} - представляет собой N-конец и -C=O представляет собой C-конец остатка;

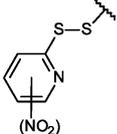
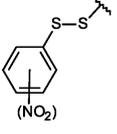
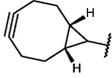
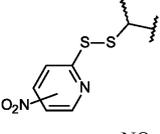
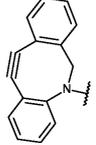
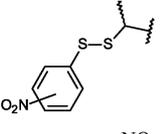
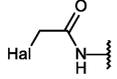
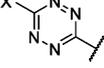
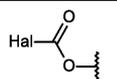
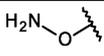
X представляет собой



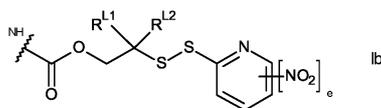
где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0 и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0;

G^L представляет собой линкер для присоединения к антителу или его активному фрагменту, где G^L выбран из

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	

(G ^{L3-1})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L9})	
(G ^{L3-2})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L10})	
(G ^{L3-3})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 <p>где Hal представляет собой I, Br, Cl</p>	(G ^{L13})	
(G ^{L5})		(G ^{L14})	

где Ag представляет собой фенилен и X' представляет собой C₁₋₄алкил;
(ib)



где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

2. Соединение по п.1, где R^L представлен формулой Ia.

3. Соединение по п.2, где a равняется:

(a) 0-3; или

(b) 0 или 1; или

(c) 0.

4. Соединение по п.2 или 3, где b1 равняется:

(a) 0-8; или

(b) 0; или

(c) 2; или

(d) 3; или

(e) 4; или

(f) 5; или

(g) 8.

5. Соединение по любому из пп.2, 3, где b2 равняется:

- (a) 0-8; или
 (b) 0; или
 (c) 2; или
 (d) 3; или
 (e) 4; или
 (f) 5; или
 (g) 8.

6. Соединение по любому из пп.2-5, где:

(i) c1 равняется:

- (a) 0 или
 (b) 1 и

(ii) c2 равняется:

- (a) 0 или
 (b) 1;

где по меньшей мере один из c1 и c2 равняется 0.

7. Соединение по любому из пп.2-6, где d равняется:

- (a) 0-3; или
 (b) 1 или 2; или
 (c) 2; или
 (d) 5.

8. Соединение по любому из пп.2-7, где:

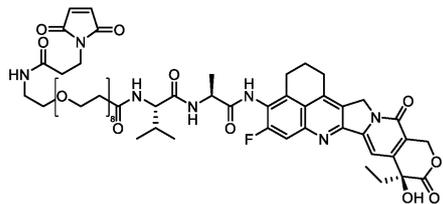
- (a) a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, d равняется 2, b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8; или
 (b) a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, d равняется 0 и b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8; или
 (c) a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, d равняется 1 и b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8; или
 (d) b1 равняется 0, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, один из a и d равняется 0 и другой из a и d равняется 1 или 5; или
 (e) a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2 и b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2} .

10. Соединение по п.1, где R^L представлен формулой Ib и:

- (a) R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой H; или
 (b) R^{L1} представляет собой H, и R^{L2} представляет собой метил; или
 (c) R^{L1} и R^{L2} одновременно представляют собой метил; или
 (d) где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу, или
 (e) где R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

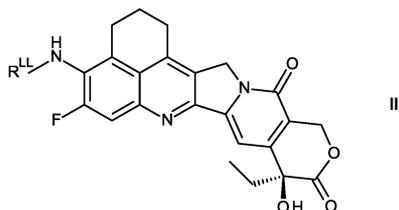
11. Соединение по п.1, представляющее собой



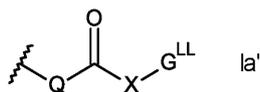
12. Конъюгат формулы IV



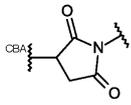
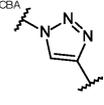
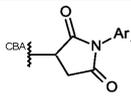
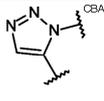
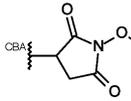
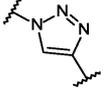
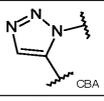
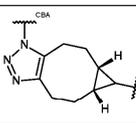
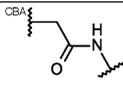
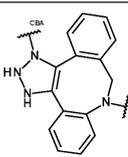
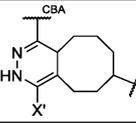
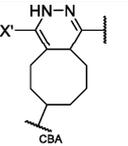
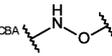
или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой антитело или его активный фрагмент, D^L представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



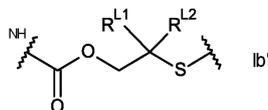
R^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к антителу или его активному фрагменту, выбранный из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1-8, и G^{LL} представляет собой линкер, присоединенный к антителу или его активному фрагменту, где G^{LL} выбран из

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	
(G^{LL4})		(G^{LL11})	
(G^{LL5})		(G^{LL12})	
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

где Ar представляет собой фенилен и X' представляет собой C_{1-4} алкил; и (ib')



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено либо в п.1, либо в п.10; и r представляет собой целое число от 1 до 20.

13. Конъюгат по п.12, где G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2} .

14. Конъюгат по п.12, где Q представляет собой дипептидный остаток, представляющий собой $NH\text{---}Val\text{---}Ala\text{---}C=O$, а равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, d равняется 2, b2 равняется 8 и G^{LL} представляет собой G^{LL1-1} , где $NH\text{---}$ представляет собой N-конец, и $\text{---}C=O$ представляет собой C-конец остатка.

15. Конъюгат по любому из пп.12-14, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до 10.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.12-15 и фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

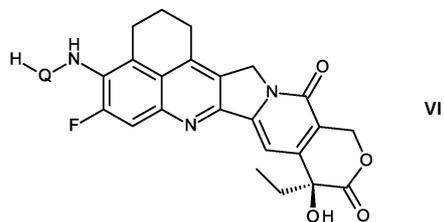
17. Применение конъюгата по любому из пп.12-15 или фармацевтической композиции по п.16 для лечения пролиферативного заболевания у субъекта.

18. Применение по п.17, где заболевание представляет собой рак.

19. Применение конъюгата по любому из пп.12-15 или фармацевтической композиции по п.16 для консервативного лечения, где консервативное лечение предназначено для лечения рака.

20. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.16, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

21. Соединение формулы VI



где Q является таким, как определено в п.1.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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