(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 034138 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.09

(21) Номер заявки
201790446

(22) Дата подачи заявки
2015.09.02

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

(54) ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

(31) **62/045,248; 62/087,040; 62/149,370; 62/164,305**
(32) **2014.09.03; 2014.12.03; 2015.04.17; 2015.05.20**
(33) **US**
(43) **2017.07.31**
(86) **PCT/US2015/048059**
(87) **WO 2016/036801 2016.03.10**

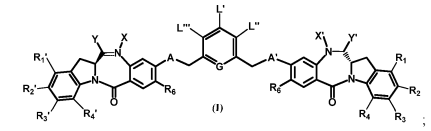
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММУНОДЖЕН, ИНК. (US)

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

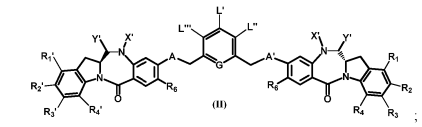
(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А., Строкова О.В., Христофоров А.А. (RU)

(56) WO-A1-2012112687
WO-A1-2010091150

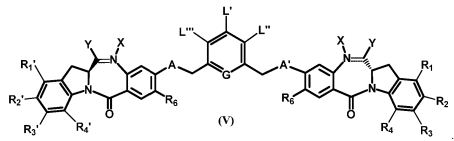
(57) Изобретение относится к новым бензодиазепиновым производным, обладающим антипролиферативной активностью, более конкретно к новым бензодиазепиновым соединениям формул (I), (II) и (V)



(I)



(II)



(V)

Изобретение также предлагает конъюгаты бензодиазепиновых соединений, присоединенных к связывающемуся с клетками агенту. Кроме того, изобретение предлагает композиции и способы, пригодные для угнетения аномального роста клеток или лечения пролиферативного расстройства у млекопитающего с использованием соединений или конъюгатов по изобретению.

034138 B1

034138 B1

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по дате подачи согласно 35 разделу Кодекса законов США, §119(e), предварительной заявки США № 62/045248, поданной 3 сентября 2014 г., предварительной заявки США № 62/087040, поданной 3 декабря 2014 г., предварительной заявки США № 62/149370, поданной 17 апреля 2015 г., и предварительной заявки США № 62/164305, поданной 20 мая 2015 г., полное содержание которых, включая все изображения, формулы, описания и пункты патентной формулы, включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

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

Уровень техники

Бензодиазепиновые производные пригодны для лечения различных расстройств и включают такие лекарственные средства, как противоэпилептические вещества (имидазо[2,1-b][1,3,5]бензотиадиазепины, патент США № 4444688; патент США № 4062852), антибактериальные вещества (пиримидо[1,2-c][1,3,5]бензотиадиазепины, GB 1476684), диуретики и гипотензивные средства (пирроло(1,2-b)[1,2,5]бензотиадиазепин 5,5 диоксид, патент США № 3506646), гиполипидемические средства (WO03091232), антидепрессанты (патент США № 3453266); средства против остеопороза (JP 2138272).

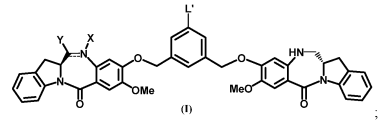
На животных моделях опухолей было показано, что бензодиазепиновые производные, такие как пирролобензодиазепины (ПБД), действуют как противоопухолевые агенты (замещенный N-2-имидазолилалкилом 1,2,5-бензотиадиазепин-1,1-диоксид, патент США № 6156746), бензопиридо или дипиридотиадиазепин (WO2004/069843), пирроло[1,2-b][1,2,5]бензотиадиазепины и производные пирроло[1,2-b][1,2,5]бензодиазепина (WO2007/015280), производные томаимицина (например, пирроло[1,4]бензодиазепины), такие как описано в WO00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930 и EP 2019104. Также известно, что бензодиазепины влияют на рост и дифференциацию клеток (Kamal A. и др., Bioorg Med Chem. 2008 Aug 15; 16(16):7804-10 (и процитированные в нем ссылки); Kumar R., Mini Rev Med Chem. 2003 Jun; 3(4):323-39 (и процитированные в нем ссылки); Bednarski J.J. и др., 2004; Sutter A.P. и др., 2002; Blatt N.B. и др., 2002), Kamal A. и др., Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J.-J., J. Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. и др., Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C.J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. и Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465 и Tozuka, Z. и др., Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. Общая структура ПБД описана в публикации заявки на патент США № 20070072846. ПБД отличаются количеством, типом и положением заместителей в ароматических А-кольцах и пиррольных С-кольцах, а также степенью насыщенности С-кольца. Их способность образовывать аддукт в малой бороздке и поперечно сшивать ДНК позволяет им препятствовать процессингу ДНК, а следовательно, обладать потенциалом использования в качестве антипролиферативных агентов.

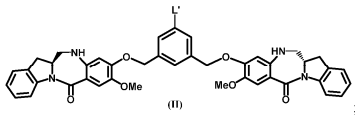
Первый поступивший на клинические исследования пирролобензодиазепин, SJG-136 (NSC 694501), является сильным цитотоксическим средством, вызывающим межнитевое поперечное сшивание ДНК (S.G. Gregson и др., 2001, J. Med. Chem., 44: 737-748; M.C. Alley и др., 2004, Cancer Res., 64: 6700-6706; J.A. Hartley и др., 2004, Cancer Res., 64: 6693-6699; C. Martin и др., 2005, Biochemistry, 44: 4135-4147; S. Arnould и др., 2006, Mol. Cancer Ther., 5: 1602-1509). По результатам I фазы клинической оценки SJG-136 обнаружилось, что данное средство было токсичным в чрезвычайно низких дозах (максимально переносимая доза 45 мкг/м^2), и были отмечены несколько побочных эффектов, включая синдром пропотевания сосудов, периферический отек, гепатотоксичность и усталость. При всех дозах отмечались повреждения ДНК лимфоцитов, находящихся в системном кровообращении (D. Hochhauser и др., 2009, Clin. Cancer Res., 15: 2140-2147). Таким образом, существует необходимость в улучшенных бензодиазепиновых производных, являющихся менее токсичными и при этом сохраняющих терапевтическую активность, для лечения различных состояний пролиферативной болезни, таких как рак.

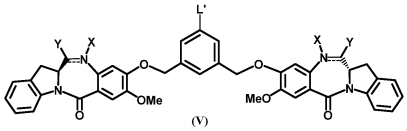
Сущность изобретения

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

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к цитотоксическому соединению, представленному любой из следующих формул:


(I);


(II); или


(V);

или его фармацевтически приемлемой соли,

где L' представлен одной из следующих формул:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J$ (B1);

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J$ (B2);

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s$ (B3);

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-J$ (C1);

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J$ (C2); и

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^s$ (C3);

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

J представляет собой -COOH, -COOMe или группу реакционноспособного сложного эфира, выбранную из N-гидроксисукцинимидного сложного эфира, N-гидроксисульфосукцинимидного сложного эфира, нитрофенильного сложного эфира, динитрофенильного сложного эфира, сульфотетрафторфенильного сложного эфира и пентафторфенильного сложного эфира;

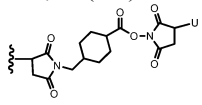
R_a и R_b, каждый независимо, представляют собой -H, (C_1-C_3)алкил или $-SO_3H$;

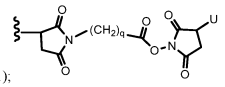
m равен целому числу от 1 до 6;

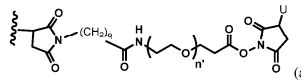
m' равен 0 или целому числу от 1 до 6 и

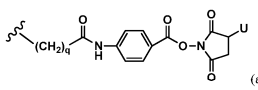
Cy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом;

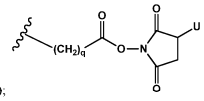
Z^s представляет собой -H, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ или выбран из любой из следующих формул:

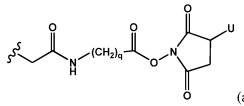

(a1);

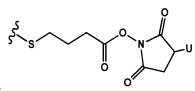

(a2);

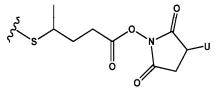

(a3);

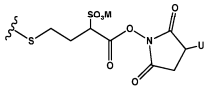

(a4);

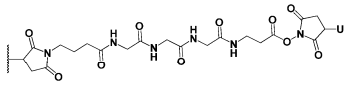

(a5);

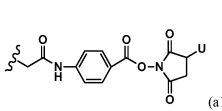

(a6);

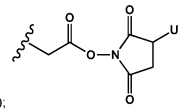

(a7);

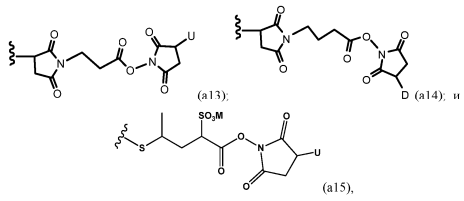

(a8);


(a9);


(a10);


(a11);


(a12);



(a13); D (a14); и (a15),

где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой -H или SO_3M;

M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;

R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила, динитрофенила, карбоксинитрофенила, пиридила или нитропиридила и

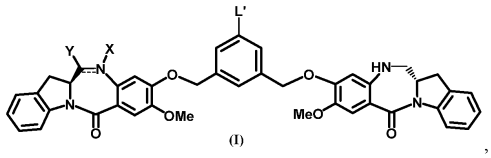
R^{d1} представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода;

двойная линия ⚌ между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой H, а если это одинарная связь, то X представляет собой H, Y представляет собой -OH или SO_3M;

R_5 независимо представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

Более конкретно, соединение согласно настоящему изобретению может быть представлено следующей формулой:



(I),

или его фармацевтически приемлемой солью.

Более конкретно, L' в соединении согласно настоящему изобретению может быть представлен следующей формулой:

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (B1);$$

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (B2);$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (C1), \text{ или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (C2).$$

L' в соединении согласно настоящему изобретению может быть представлен следующей формулой:

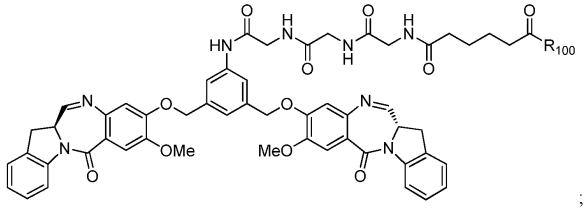
$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (B3); \text{ или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (C3).$$

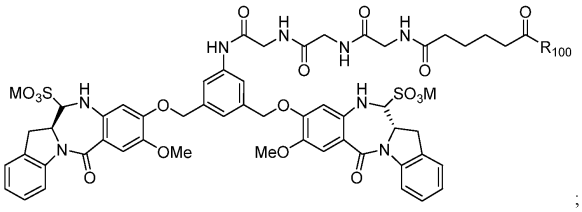
Еще более конкретно, P может представлять собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков. Еще более конкретно, P может быть выбран из

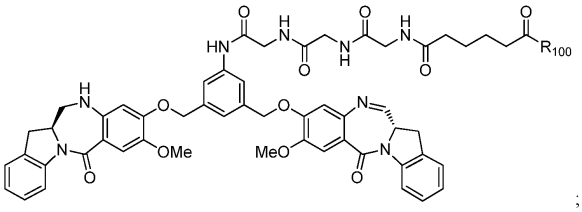
Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala.

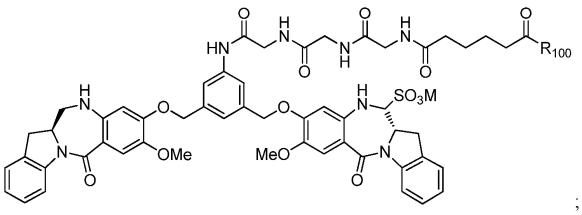
В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение выбрано из любой из следующих формул:

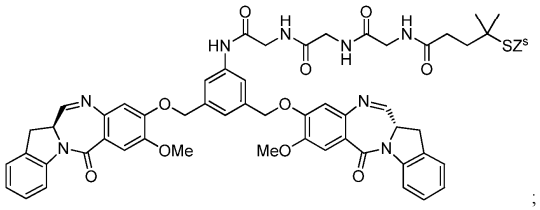


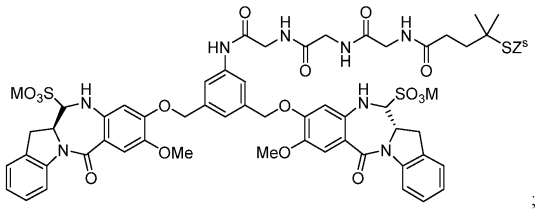
;

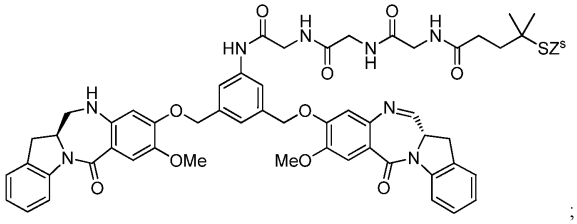

;


;

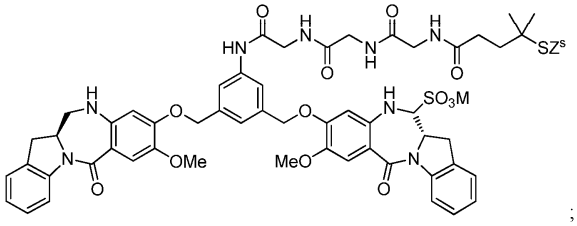

;


;

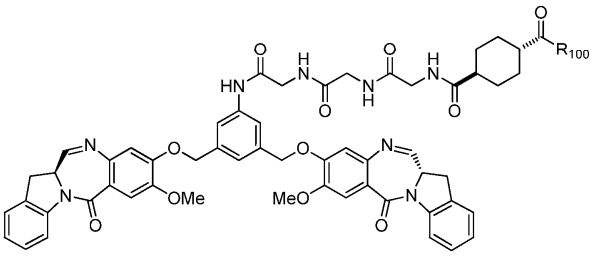

;


HN
SZ^s
OMe
MeO

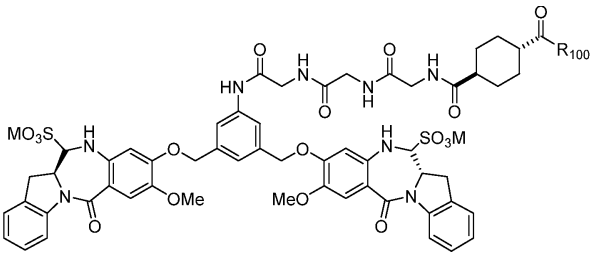
;


HN
SZ^s
SO$_3$M
OMe
MeO

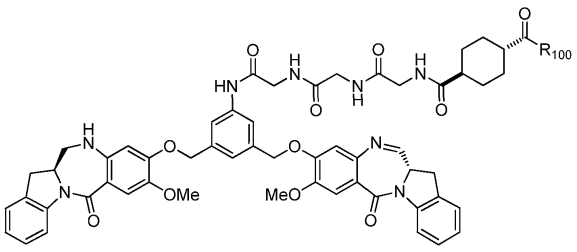
;


HN
R$_{100}$
OMe
MeO

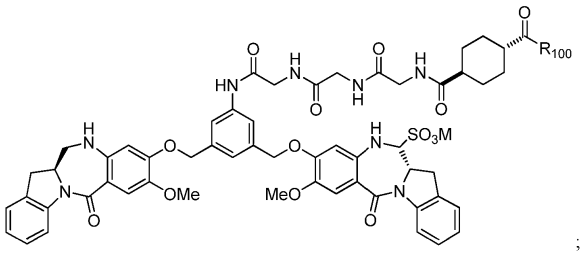
;


HN
R$_{100}$
MO$_3$S
SO$_3$M
OMe
MeO

;

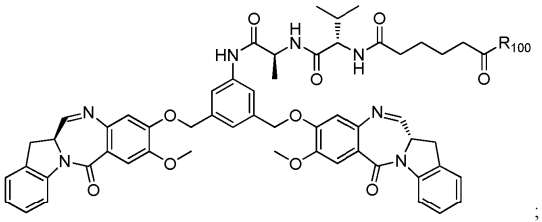


;

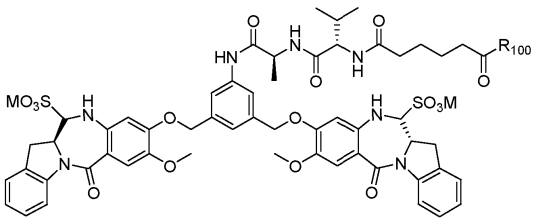


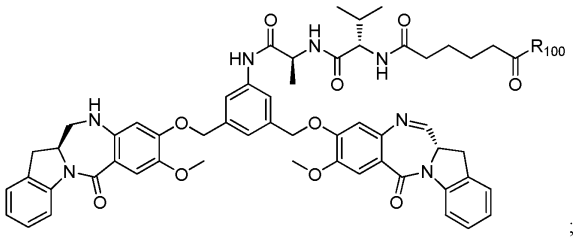
;

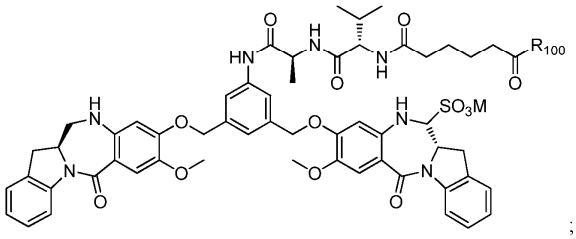
;

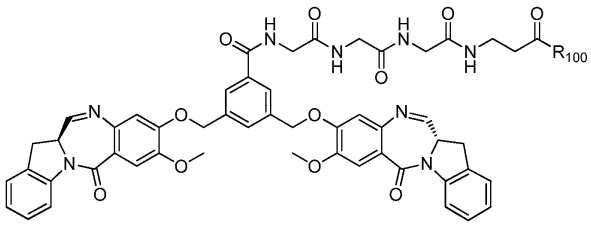


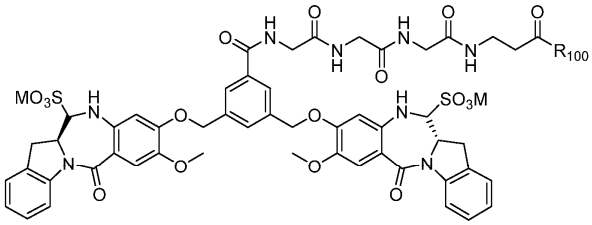
;

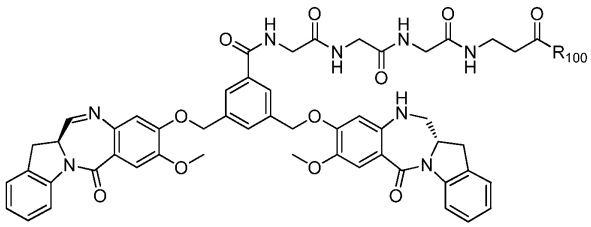


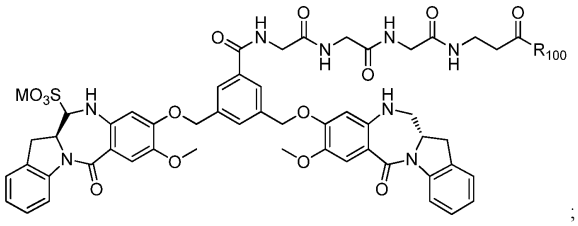

;

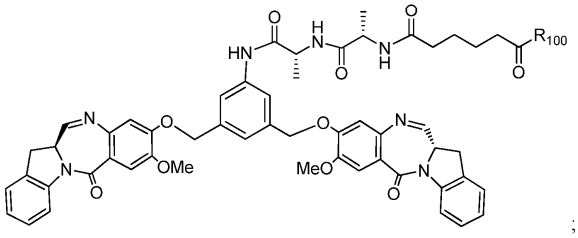

;

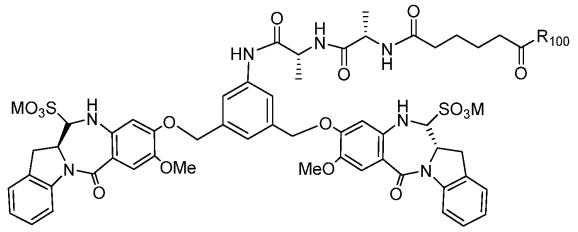

;

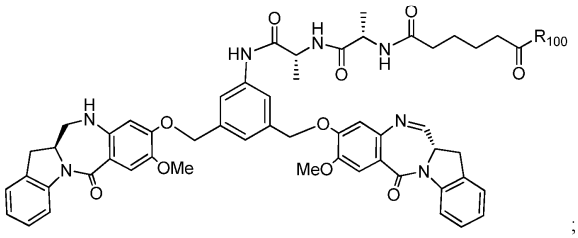


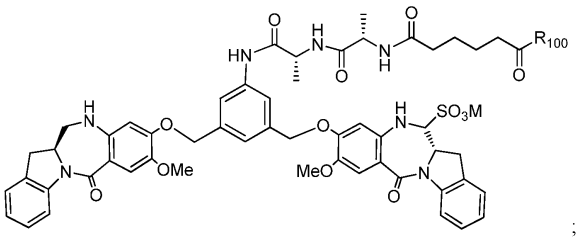

;

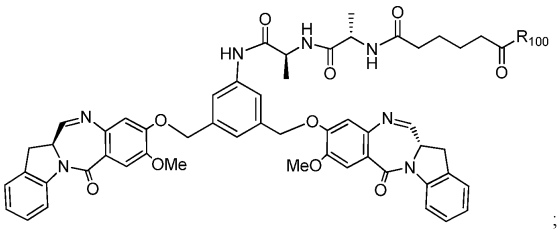

;

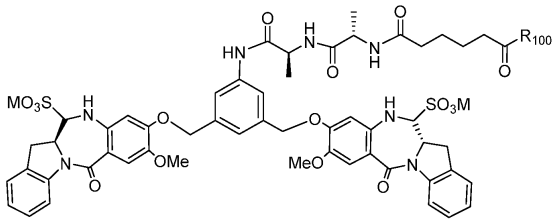

;

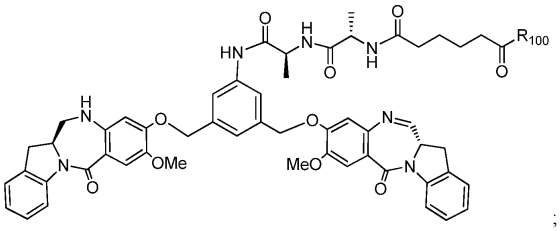

;

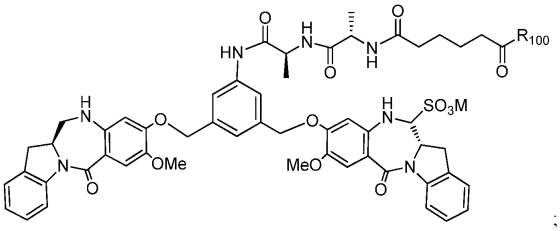

;

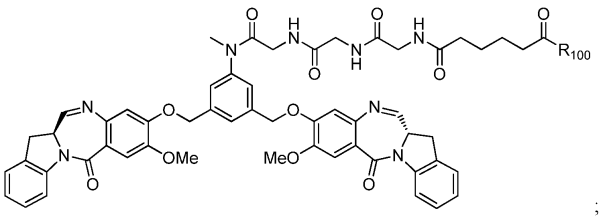

;

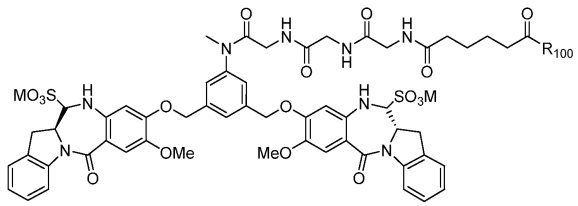

;

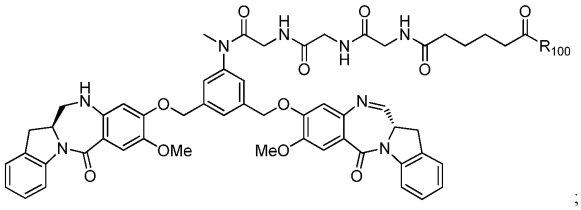

;


;

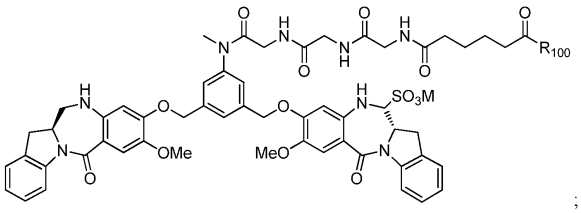

;


;

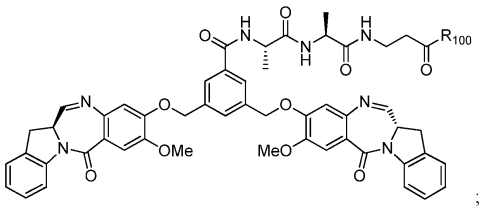




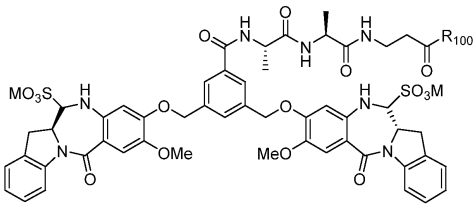
;

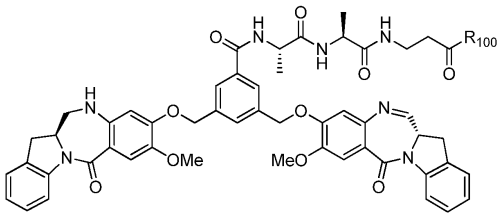


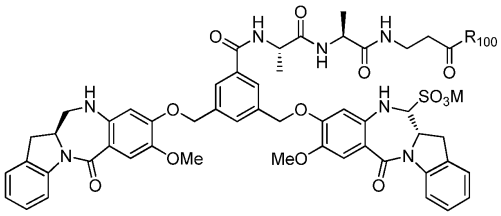
;

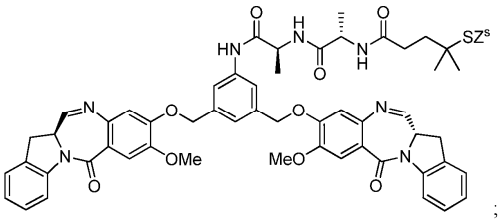


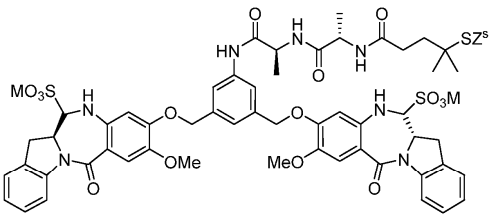
;

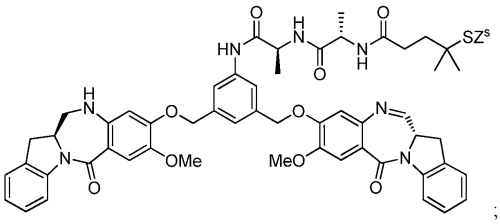


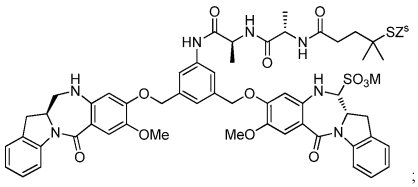

;


;


;


;


;

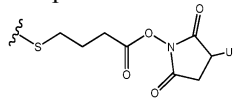

;

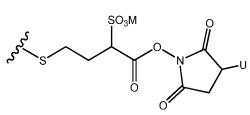
или их фармацевтически приемлемых солей,

где R_{100} представляет собой -OH, -OMe или ;

M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;

Z^s представляет собой -H, $-SR^d$ или выбран из любой из следующих формул:

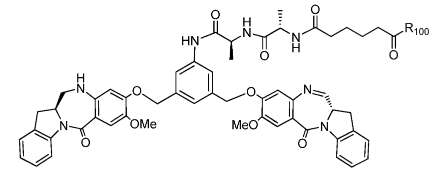

(a7); и


(a9);

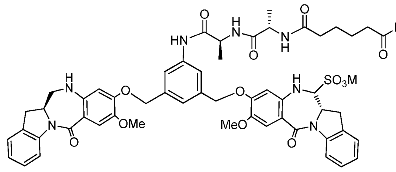
где U представляет собой -H или SO_3M и

R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила, карбоксинитрофенила, пиридила и нитропиридила.

Еще в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение выбрано из одной из следующих формул:

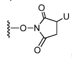


; и



;

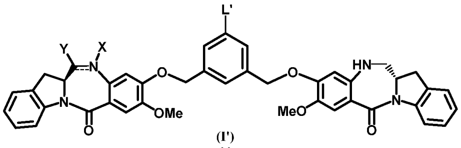
или их фармацевтически приемлемых солей,

где R_{100} представляет собой -OH, -OMe или  ;

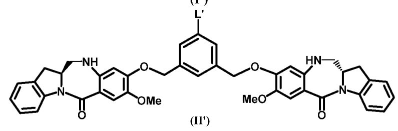
U представляет собой -H или SO_3M и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

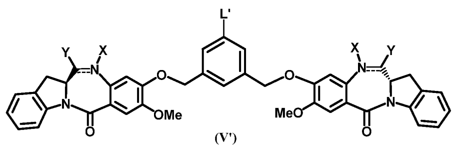
В другом варианте осуществления настоящее изобретение имеет отношение к конъюгату, включающему цитотоксическое соединение и связывающийся с клетками агент (СКА), при этом цитотоксическое соединение ковалентно связано с СКА, где СКА представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с целевой клеткой, и указанное цитотоксическое соединение представлено одной из следующих формул:



(I')



(II') ;



(V') ,

или их фармацевтически приемлемых солей,

где L' представлен одной из следующих формул:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (B2');

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (C1');

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (C2');

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (B3'); и

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (C3');

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

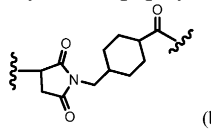
R_a и R_b, каждый независимо, представляют собой -H, (C_1-C_3)алкил или $-SO_3H$;

m равен целому числу от 1 до 6;

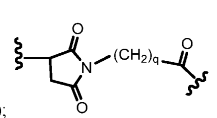
m' равен 0 или целому числу от 1 до 6 и

Cy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом;

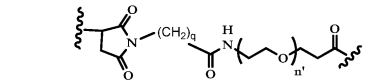
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:

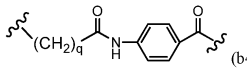
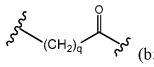


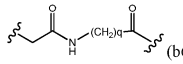
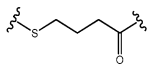
(b1);

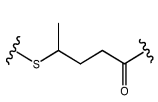
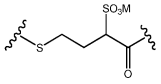


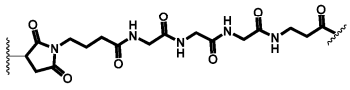
(b2);

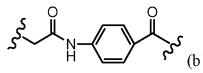
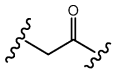

(b3);

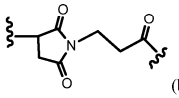
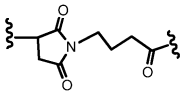

(b4);

(b5);

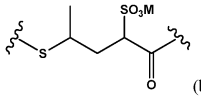

(b6);

(b7);


(b8);

(b9);


(b10);


(b11);

(b12);


(b13);

(b14); и


(b15),

где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой H или SO_3M и

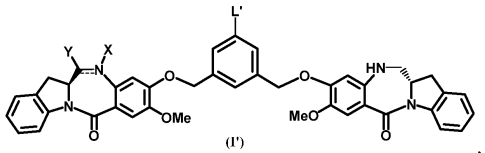
M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;

двойная линия ⚌ между N и C представляет одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой H, а если это одинарная связь, то X представляет собой H, Y представляет собой -OH или SO_3M;

R_5 независимо представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения соединение в конъюгате представлено следующей формулой:


(I')

,

или его фармацевтически приемлемой солью.

Более конкретно, L' может быть представлен следующей формулой:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (B2');

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (C1'), или

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (C2').

Альтернативно, L' может быть представлен следующей формулой:

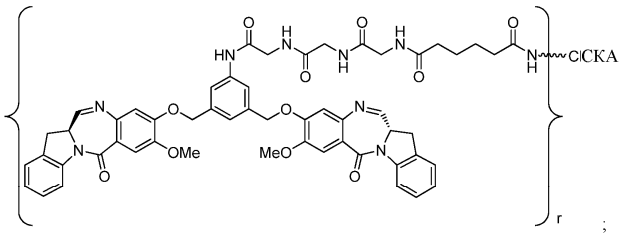
$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (B3'); или

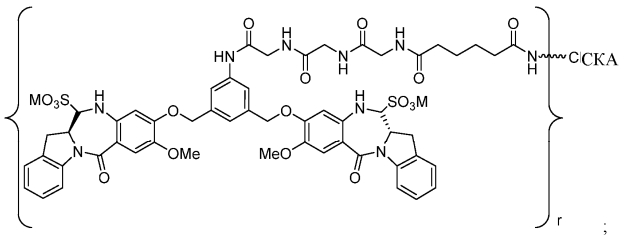
$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (C3').

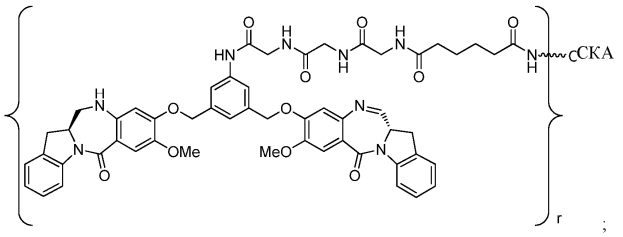
Еще более конкретно, P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков. Еще более конкретно, P выбран из

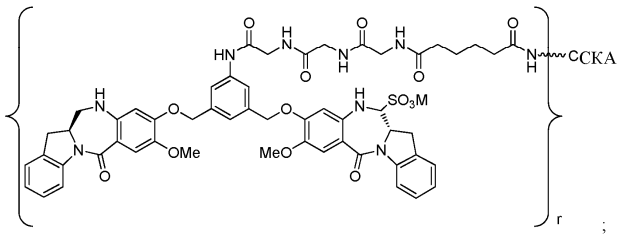
Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala.

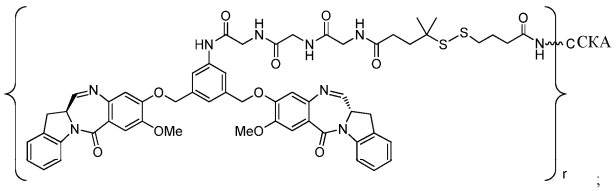
В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат выбран из любой из следующих формул:

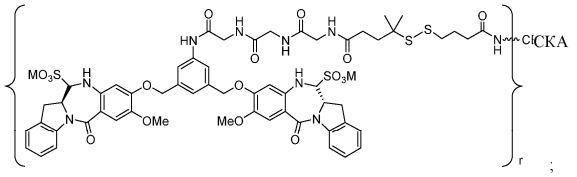


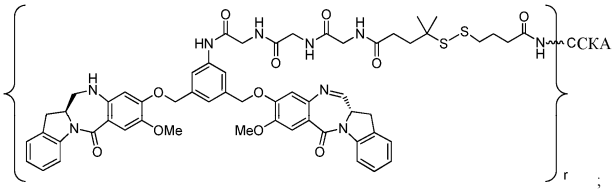


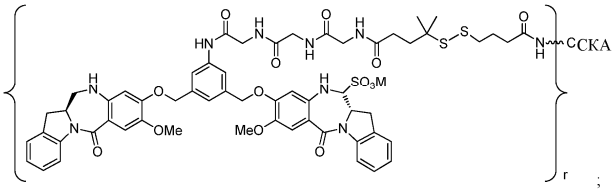


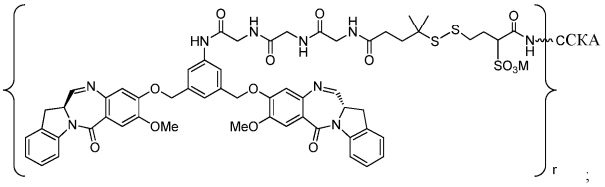


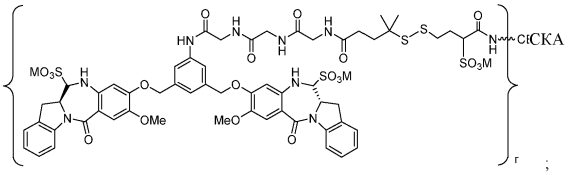


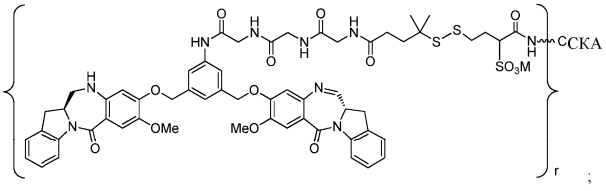


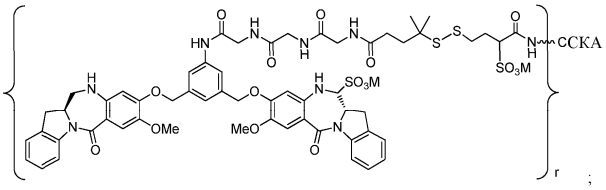


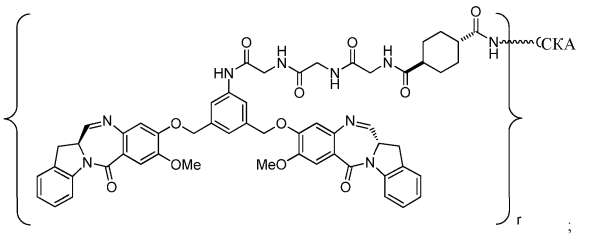


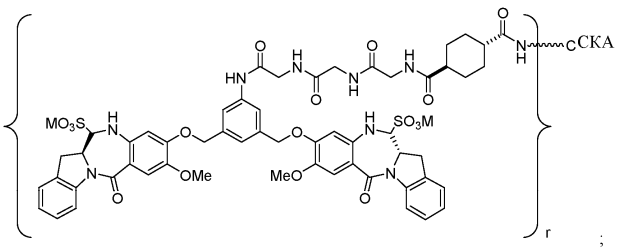




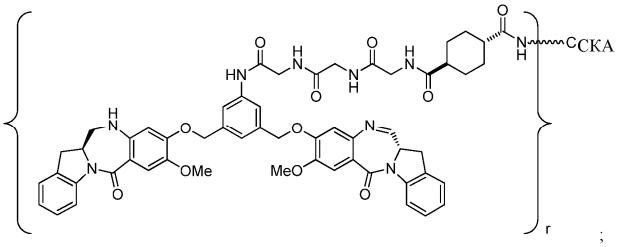




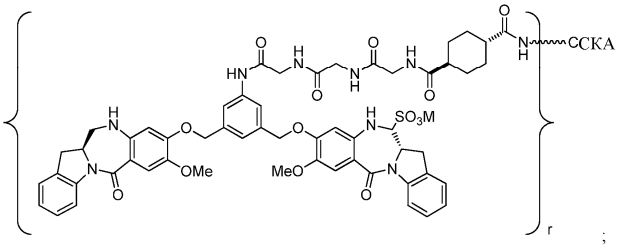




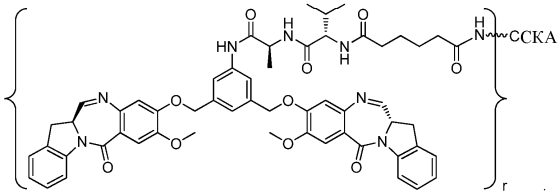
;



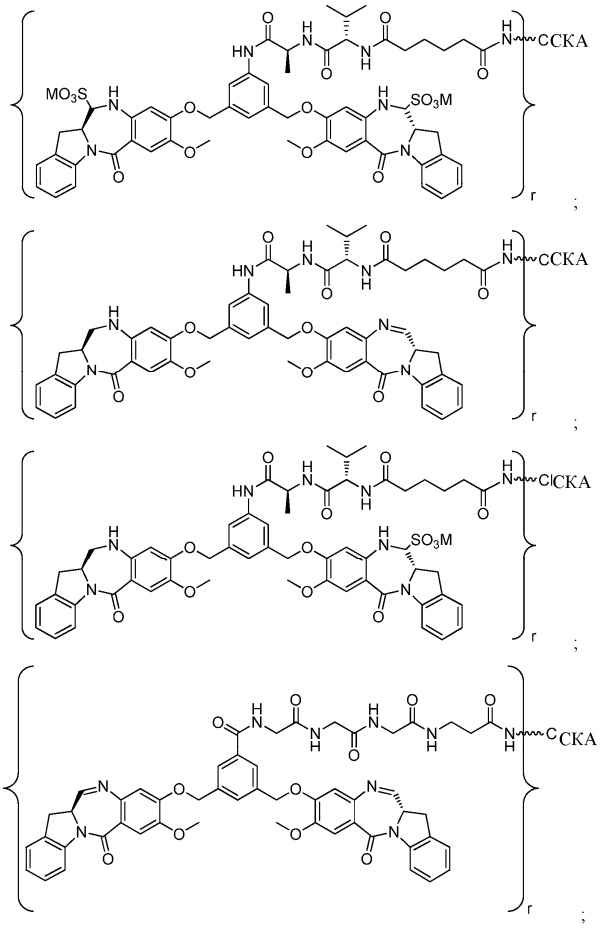
;

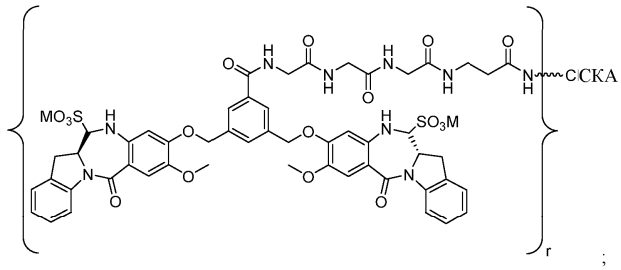


;

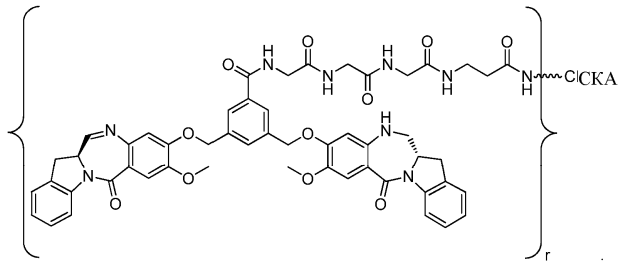


;

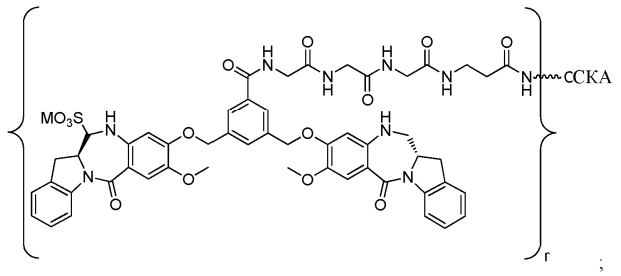




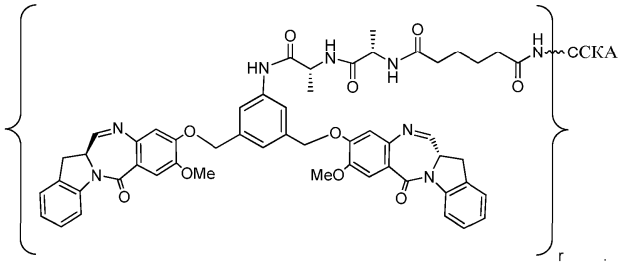
;



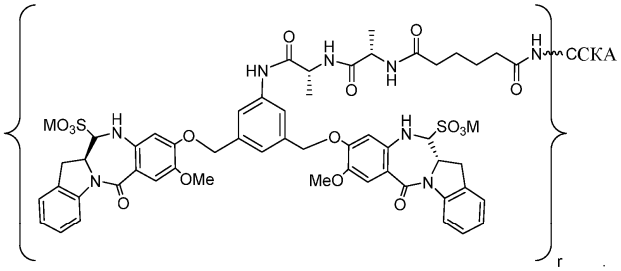
;



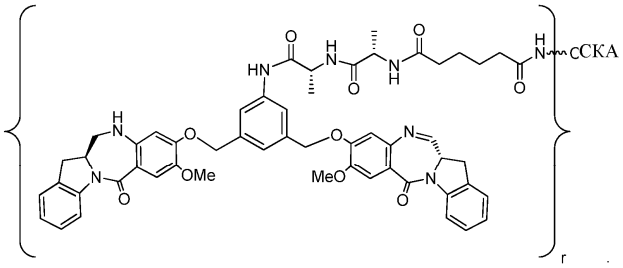
;



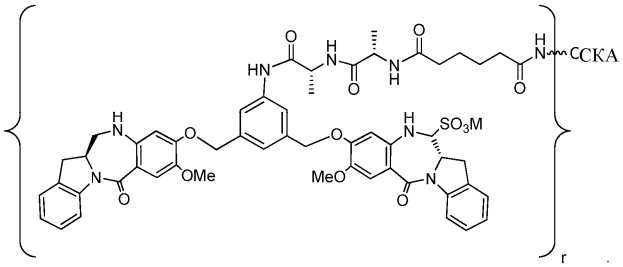
;


CCKA
MO3S
SO3M
OMe
MeO

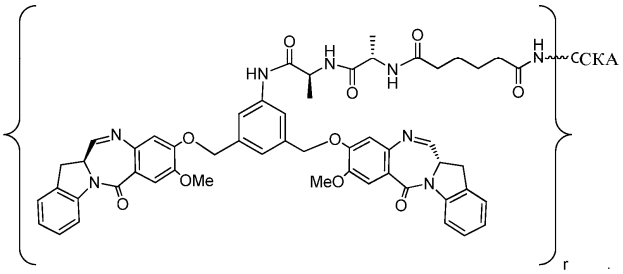
r ;


CCKA
OMe
MeO

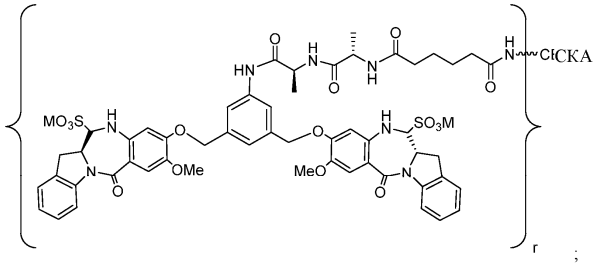
r ;


CCKA
SO3M
OMe
MeO

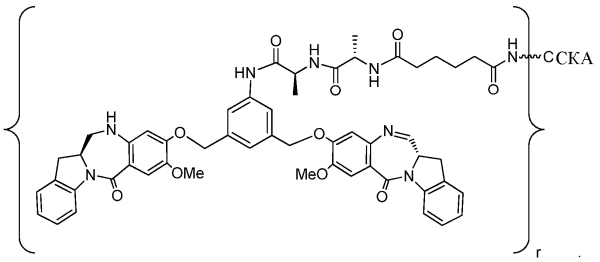
r ;


CCKA
OMe
MeO

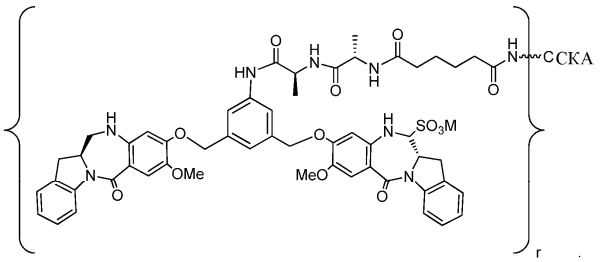
r ;



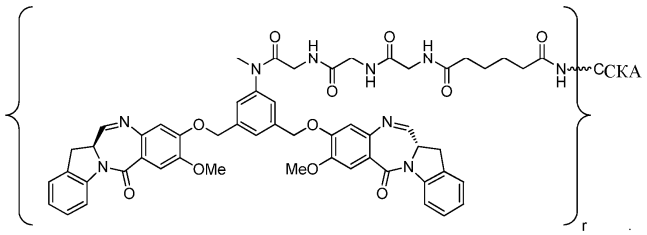
;



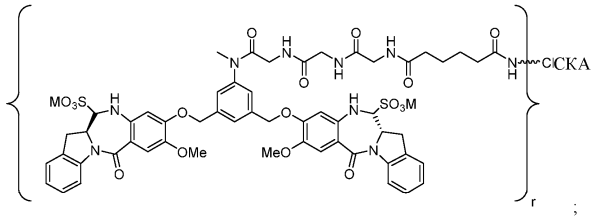
;

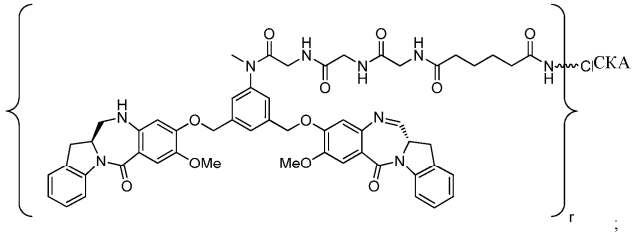


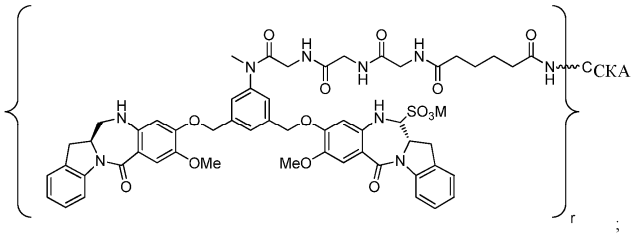
;

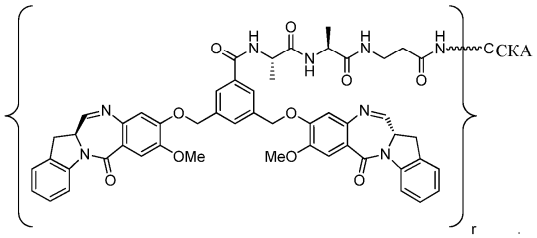


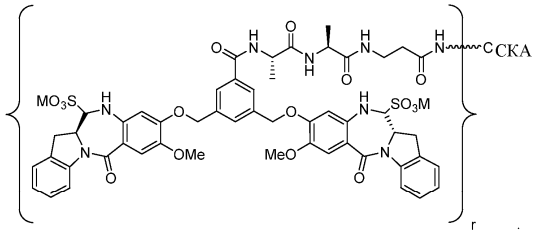
;



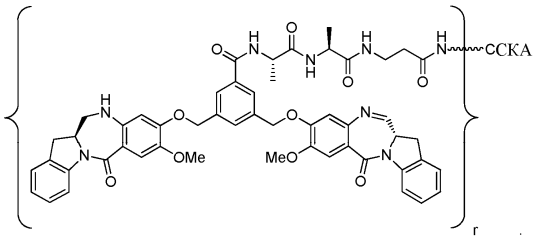




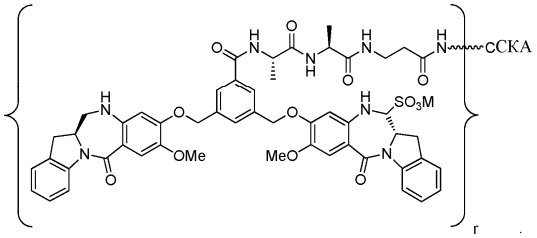



MO3S
SO3M
OMe
MeO
CCKA

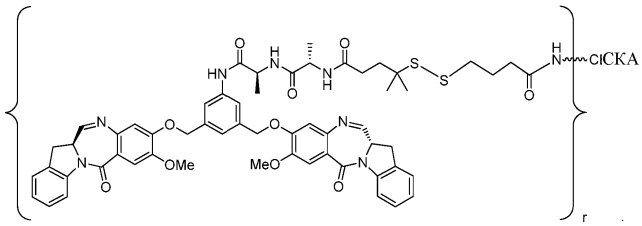
r ;


OMe
MeO
CCKA

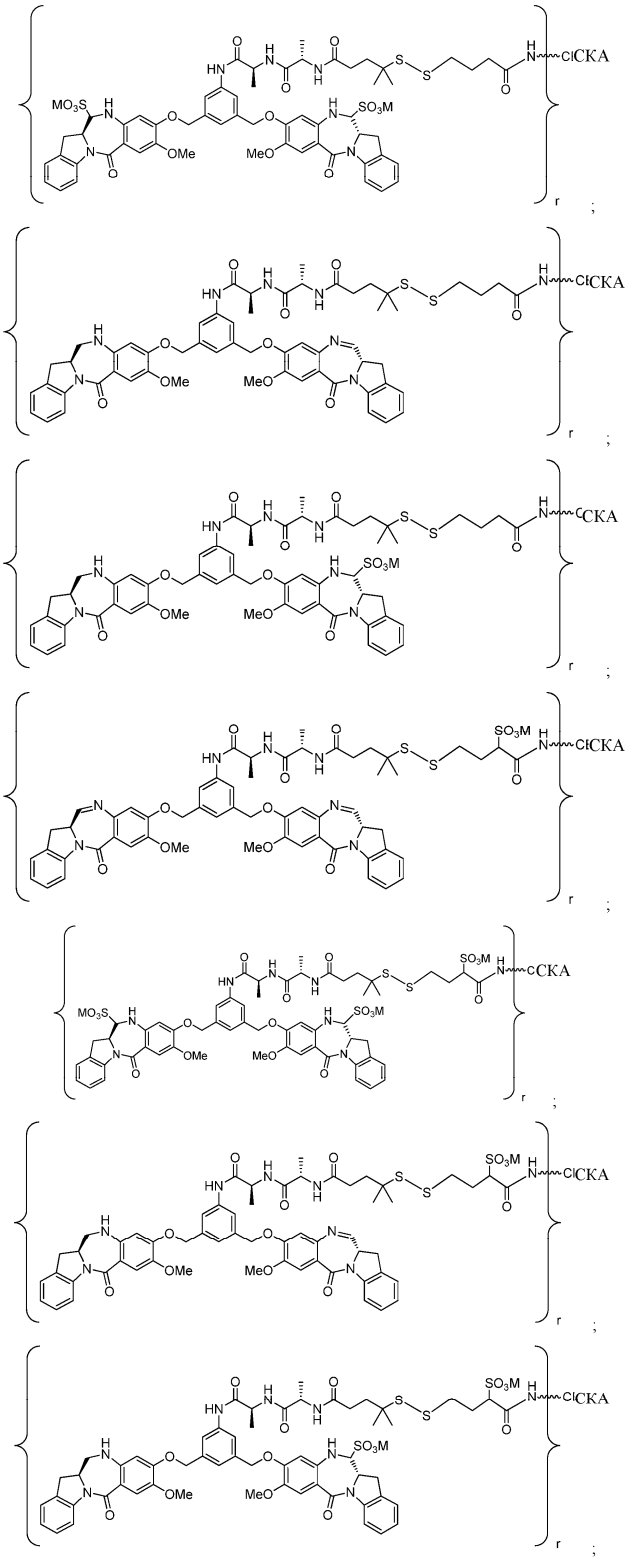
r ;


SO3M
OMe
MeO
CCKA

r ;


OMe
MeO
ClCKA

r ;

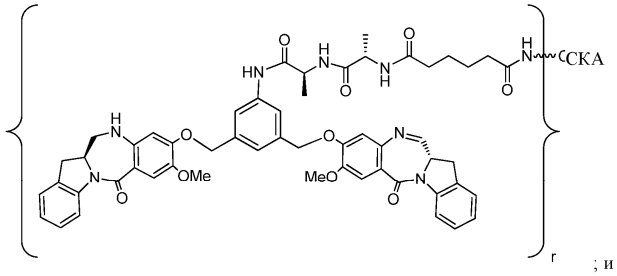


или их фармацевтически приемлемых солей,

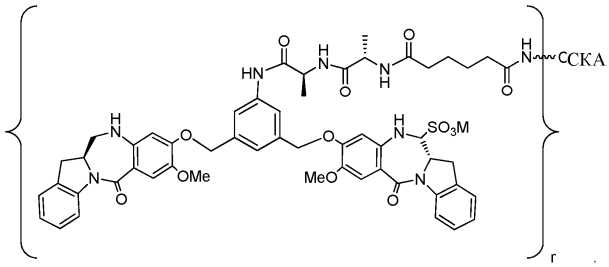
где r равен целому числу от 1 до 10 и

M представляет собой H^+, Na^+ или K^+.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат представлен одной из следующих формул:



; и



;

или его фармацевтически приемлемой солью,

где СКА представляет собой антитело;

r представляет собой целое число от 1 до 10 и

M представляет собой H^+, Na^+ или K^+.

Более конкретно, антитело или фрагмент антитела в конъюгате является одноцепочечным антителом, моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом моноклонального антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, химерным антителом, фрагментом химерного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, доменным антителом или фрагментом доменного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой. Антитело может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против фолатного рецептора или фрагмента такого антитела, антитела против EGFR или фрагмента такого антитела, антитела против CD33 или фрагмента такого антитела, антитела против CD19 или фрагмента такого антитела, антитела против Muc1 или фрагмента такого антитела и антитела против CD37 или фрагмента такого антитела. Антитело может являться (a) антителом с измененной поверхностью, одноцепочечным антителом с измененной поверхностью или фрагментом упомянутых антител с измененной поверхностью, (b) моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом упомянутых моноклональных антител или (c) гуманизированным антителом, одноцепочечным гуманизированным антителом или фрагментом гуманизированного антитела. Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения рака у млекопитающего, содержащей вышеупомянутый конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще в одном другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества вышеупомянутого соединения или конъюгата.

Более конкретно, рак представляет собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, меланому, рак легкого, рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак простаты, эндометриальный рак, лимфому, миелодиспластический синдром (МДС), перитонеальный рак, или лейкоз. Еще более конкретно, рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому или миелодиспластический синдром, а лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый моноцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, эозинофильный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана аффинность связывания конъюгата huMOV19-14 с клетками T47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

На фиг. 2 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата huMOV19-14 in vitro.

На фиг. 3 показано, что конъюгат huMOV19-14 оказывает слабый цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

На фиг. 4A-4C показана цитотоксичность конъюгата huMy9-6-14 in vitro против различных клеточных линий.

На фиг. 5A и 5B показано, что конъюгат huMy9-6-14 оказывает цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

На фиг. 6 показана эффективность конъюгатов huMOV19-80 и huMOV19-90 in vivo у несущих NCI-H2110 мышей с ТКИД.

На фиг. 7A-7D показаны масс-спектрометрические профили образцов конъюгатов согласно настоящему изобретению.

На фиг. 8 показан масс-спектрометрический профиль конъюгата huML66-90.

На фиг. 9 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата huML66-90 in vitro.

На фиг. 10-12 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгата huMOV19-90 in vitro.

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

На фиг. 14 показана эффективность конъюгата huMOV19-90 in vivo у несущих NCI-H2110 мышей с ТКИД.

На фиг. 15A и 15B показана аффинность связывания конъюгата huMOV19-90 с клетками T47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

На фиг. 16 показаны масс-спектрометрические профили образцов конъюгатов согласно настоящему изобретению.

На фиг. 17 показана эффективность конъюгата huML66-90 in vivo у несущих NCI-H1703 NSCLC мышей с ТКИД.

На фиг. 18 показана фармакокинетика huMOV19-90 в мышах CD-1.

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

На фиг. 20 показана аффинность связывания конъюгата huMOV19-107 с клетками T47D по сравнению с неконъюгированным антителом huMOV19.

На фиг. 21 показаны цитотоксичность и специфичность конъюгатов huMOV19-90 и huMOV19-107 in vitro.

На фиг. 22 показана эффективность конъюгата huMOV19-90 in vivo у несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110 NSCLC мышей с ТКИД.

На фиг. 23 показана эффективность конъюгата huMOV19-90 in vivo у несущих эндометриальные ксенотрансплантаты Hec-1b мышей с ТКИД.

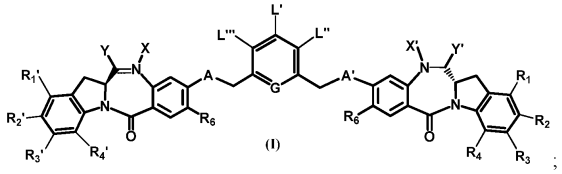
На фиг. 24 показана эффективность конъюгата huMOV19-90 in vivo у несущих эндометриальные ксенотрансплантаты Ishikawa мышей с ТКИД.

На фиг. 25 показана эффективность конъюгата huMOV19-107 in vivo у несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110 NSCLC мышей с ТКИД.

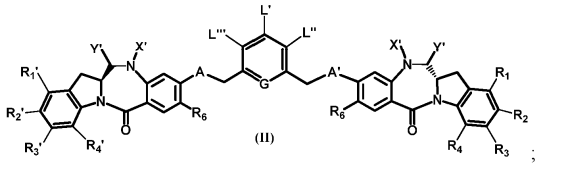
На фиг. 26 показана аффинность связывания конъюгата huCD123-6Gv4,7S3-90 с клетками HNT-34 по сравнению с неконъюгированным антителом.

Подробное описание изобретения

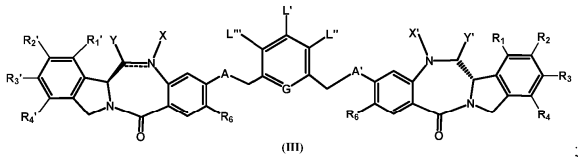
В настоящем документе описаны цитотоксические соединения, представленные любой из следующих формул:



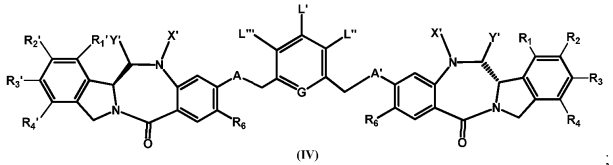
(I) ;



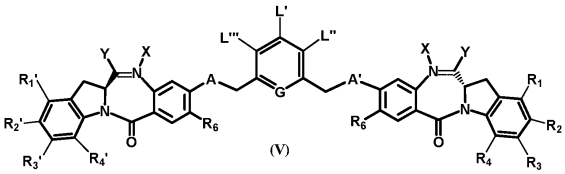
(II) ;



(III) ;

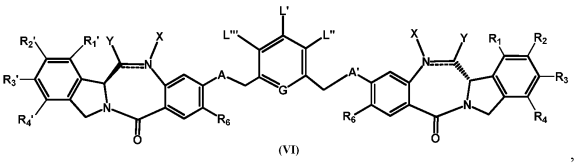


(IV) ;



(V)

; или



(VI)

,

или его фармацевтически приемлемые соли,

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

$$-Z_1\text{-}P\text{-}Z_2\text{-}R_x\text{-}J \qquad (A)$$

а два других одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, галогена, гуанидиния [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R", $-NO_2$, -NR'COR", -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R"$, цианогруппы, азидной группы, -COR', -OCOR' и -OCONR'R";

один из Z_1 и Z_2 является -C(=O)-, а другой является $-NR_5-$;

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

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

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

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

Y является уходящей группой, выбранной из -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R", -NR'R", -NR'COR", -NR'NR'R", необязательно замещенного 5- или 6-членного азотосодержащего гетероцикла (например, пиперидина, тетрагидропиррола, пиразола, морфолина и т.д., присоединенного через атом азота), гуанидина, представленного -NR'(C=NH)NR'R", аминокислотного остатка или пептида, представленного -NRCOP', -SR, -SOR', галогена, цианогруппы, азидной группы, $-OSO_3H$, сульфита ($-SO_3H$ или $-SO_2H$), метабисульфита ($H_2S_2O_5$), моно-, ди-, три- и тетра-тиофосфата (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2), тиофосфатного эфира ($R^iO)_2PS(OR^i$), R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, тиосульфата (HS_2O_3), дитионита (HS_2O_4), дитиофосфата ($P(=S)(OR^k)(S)(OH)$), гидроксамовой кислоты ($R^kC(=O)NOH$) и формальдегидсульфоксилата ($HOCH_2SO_2^-$) или их комбинаций, где R^1 является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода и замещенным по меньшей мере одним заместителем, выбранным из $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ и $-PO_3H$; R^i может быть дополнительно замещен заместителем для описанного здесь алкила; R^j является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода; $R^{k'}$ является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероциклилом или гетероарилом;

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

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

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

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

n является целым числом от 1 до 24;

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

Y' выбран из -H, оксогруппы, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, необязательно замещенного 6-18-членного арила, необязательно замещенного 5-18-членного гетероарильного кольца, содержащего один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или необязательно замещенного 3-18-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-6 гетероатомов;

каждый из R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' независимо выбран из группы, состоящей из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, галогена, гуанидиния [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R", $-NO_2$, -NCO, -NR'COR", -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3^-H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R"$, цианогруппы, азидной группы, -COR', -OCOR' и -OCONR'R";

R_6 является -H, -R, -OR, -SR, -NR'R", $-NO_2$ или галогеном;

G является -CH- или -N-;

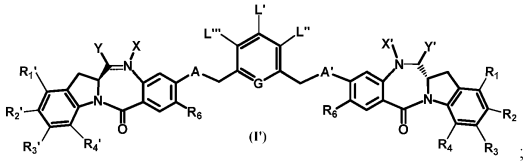
A и A' одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -O-, оксогруппы (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-NR_5$ и $-CRR'N(R_5)-$ и

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

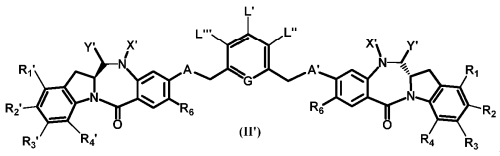
В одном варианте реализации для соединений структурных формул (I)-(VI) G является -CH-.

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

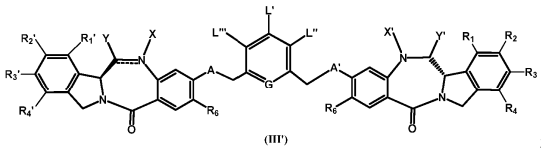
Более конкретно, описанные здесь конъюгаты могут включать цитотоксическое соединение и связывающийся с клетками агент (СКА), при этом цитотоксическое соединение ковалентно связано с СКА, где указанное цитотоксическое соединение описано одной из следующих формул:



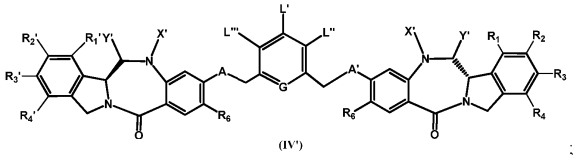
;



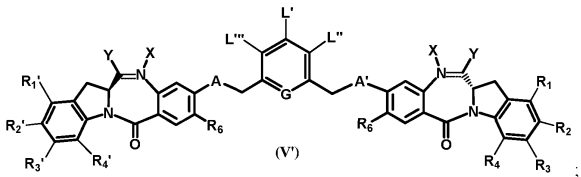
;



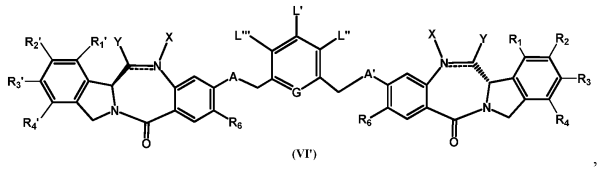
;



;



; или



(VI')

,

или его фармацевтически приемлемую соль,

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

$$-Z_1\text{-}P\text{-}Z_2\text{-}R_x\text{-}J' \qquad (A')$$

а два других одинаковы или отличаются и независимо выбраны из -H, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $(CH_2CH_2O)_n$-R^c, галогена, гуанидиний [-NH(C=NH)NH_2], -OR, -NR'R", -NO_2, -NR'COR", -SR, сульфоксида, представленного -SOR', сульфона, представленного -SO_2R', сульфоната -SO_3M, сульфата -OSO_3M, сульфонамида, представленного -SO_2NR'R", цианогруппы, азидной группы, -COR', -OCOR' и -OCONR'R";

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

описанным в настоящем документе, которые могут быть использованы в практике настоящего изобретения.

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

Определения.

Здесь и далее термин "связывающийся с клетками агент" или "СКА" обозначает соединение, способное связываться с клеткой (например, с лигандом, находящимся на поверхности клетки) или с лигандом, ассоциированным с клеткой или находящимся близко к ней, предпочтительно специфичным образом. В определенных вариантах осуществления связывание с клеткой или лигандом, находящимся на клетке или близко к ней, является специфическим. СКА могут включать пептиды и непептидные вещества.

"Линейный или разветвленный алкил" здесь и далее обозначает насыщенный одновалентный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющий от одного до двадцати атомов углерода. Примеры алкилов включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, 1-бутил, 2-метил-1-пропил, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-бутил, 2-метил-2-пропил, 1-пентил, 2-пентил 3-пентил, 2-метил-2-бутил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил), 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил, 3,3-диметил-2-бутил, 1-гептил, 1-октил и т.п. Предпочтительно алкил имеет от одного до десяти атомов углерода. Более предпочтительно алкил имеет от одного до четырех атомов углерода.

"Линейный или разветвленный алкенил" здесь и далее обозначает одновалентный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющий от одного до двадцати атомов углерода и по меньшей мере одно ненасыщенное положение, то есть углерод-углеродную двойную связь, при этом понятие алкенильного радикала охватывает радикалы "цис"- и "транс"-ориентации или, альтернативно, "E"- и "Z"-ориентации. Примеры включают, но не ограничиваются ими, этиленил или винил ($-CH=CH_2$), аллил ($-CH_2CH=CH_2$) и т.п. Предпочтительно алкенил имеет от двух до десяти атомов углерода. Более предпочтительно алкенил имеет от двух до четырех атомов углерода.

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

Термины "карбоцикл", "карбоциклил" и "карбоциклическое кольцо" обозначают одновалентное неароматическое насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, имеющее от 3 до 12 атомов углерода как моноциклическое кольцо или от 7 до 12 атомов углерода как бициклическое кольцо. Бициклические карбоциклы, имеющие от 7 до 12 атомов, могут быть скомпонованы, например, как бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система, и бициклические карбоциклы, имеющие от 9 до 10 атомов, могут быть скомпонованы как бицикло[5,6] или [6,6] система, или как мостиковые системы, такие как бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан и бицикло[3.2.2]нонан. Примеры моноциклических карбоциклов включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-энил, 1-циклопент-2-энил, 1-циклопент-3-энил, циклогексил, 1-циклогекс-1-энил, 1-циклогекс-2-энил, 1-циклогекс-3-энил, циклогексадиенил, циклогептил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и т.п.

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

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

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

"Арил" означает одновалентный ароматический углеводородный радикал, имеющий 6-18 атомов углерода, полученный устранением одного атома водорода от отдельного атома углерода начальной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в иллюстративных структурах как "Ar." Арилы включают бициклические радикалы, включающие ароматическое кольцо, сконденсированное с насыщенным кольцом, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются ими, радикалы-остатки бензола (фенил), замещенных бензолов, нафталина, антрацена, 1,2-

дигидронафталина, инденил, инданил, 1,2,3,4-тетрагидронафтил и т.п. Предпочтительно арил является фенильной группой.

Термины "гетероцикл", "гетероциклил" и "гетероциклическое кольцо" здесь и далее используются взаимозаменяемо и обозначают насыщенный или частично ненасыщенный (то есть имеющий одну или более двойные и/или тройные связи в кольце) карбоциклический радикал с от 3 до 18 атомов, в котором хотя бы один атом кольца является гетероатомом, выбранным из азота, кислорода, фосфора и серы, остальные атомы кольца являются углеродными, и где один или более атомов кольца необязательно замещены независимо одним или более заместителями, описанными ниже. Гетероцикл может быть моноциклом, имеющим от 3 до 7 кольцевых членов (2-6 атомов углерода и 1-4 гетероатома, выбранных из N, O, P и S) или бициклом, имеющим от 7 до 10 кольцевых членов (4-9 атомов углерода и 1-6 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например бицикло[4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A. "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в особенности разделы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности т. 13, 14, 16, 19 и 28; а также J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. Понятие "гетероциклил" также охватывает радикалы, в которых гетероциклические радикалы сконденсированы с насыщенным, частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваются ими, пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротиопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2H-пиранил, 4H-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0] гептанил и азабицикло[2.2.2]гексанил. Спирогруппы также входят в объем данного определения. Примерами гетероциклической группы, в которой атомы кольца замещены оксо (=O) группами, являются пиримидинонил и 1,1-диоксотиоморфолинил.

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

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

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

Гетероатомы в гетероариле или гетероциклиле включают окисленные формы, такие как NO, SO и SO_2.

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

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

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

зано иное).

Если заместитель описан как "необязательно замещенный", то заместитель может быть либо (1) не замещенным, либо (2) замещенным. Если углеродный атом заместителя описан как необязательно замещенный одним или более из перечня заместителей, то один или более водородных атомов при этом углеродном (в тех случаях, когда при нем есть таковые) могут по отдельности и/или вместе быть заменены независимо выбранным необязательным заместителем. Если азотный атом заместителя описан как необязательно замещенный одним или более из перечня заместителей, то один или более водородных атомов при этом азотном (в тех случаях, когда при нем есть таковые) могут быть заменены независимо выбранным необязательным заместителем. Один пример заместителя может быть описан как -NR'R", где R' и R" вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать гетероциклическое кольцо. Гетероциклическое кольцо, образованное R' и R" вместе с атомом азота, к которому они присоединены, может быть частично или полностью насыщенным. В одном варианте осуществления гетероциклическое кольцо состоит из 3-7 атомов. В другом варианте осуществления гетероциклическое кольцо выбрано из группы, включающей пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, изоксазолил, пиридил и тиазолил.

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

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

Если заместитель описан как необязательно замещенный неводородными заместителями вплоть до определенного их количества, то этот заместитель может быть либо (1) не замещен; либо (2) замещен неводородными заместителями вплоть до этого определенного их количества, или вплоть до максимального числа замещаемых положений заместителя, в зависимости от того, что меньше. Так, например, если заместитель описан как гетероарил, необязательно замещенный неводородными заместителями в количестве до 3-х, то любой гетероарил с менее чем 3-я замещаемыми положениями будет необязательно замещен не более чем таким количеством неводородных заместителей, сколько у этого гетероарила имеется замещаемых положений. Такие заместители для неограничивающего примера могут быть выбраны из линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, арила, гетероарила, гетероциклила, галогена, гуанидиния [$-NH(C=NH)NH_2$], $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, сульфоксида, представленного $-SOR^{101}$, сульфона, представленного $-SO_2R^{101}$, сульфоната $-SO_3M$, сульфата $-OSO_3M$, сульфонамида, представленного $-SO_2NR^{101}R^{102}$, цианогруппы, азидной группы, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ и полиэтиленгликолевого звена $(-CH_2CH_2O)_nR^{101}$, где M является H или катионом (таким как Na^+ или K^+); R^{101}, R^{102} и R^{103}, каждый независимо, выбран из H, линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, полиэтиленгликолевого звена $(-CH_2CH_2O)_n-R^{104}$, где n является целым числом от 1 до 24, арила, имеющего от 6 до 10 атомов углерода, гетероциклического кольца, имеющего от 3 до 10 атомов углерода, и гетероарила, имеющего от 5 до 10 атомов углерода; и R^{104} является H или линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода, при этом алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил и гетероциклил в группах, представленных R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103} и R^{104}, необязательно замещены одним или более (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более) заместителями, независимо выбранными из галогена, -OH, -CN, $-NO_2$ и незамещенного линейного или разветвленного алкила, имеющего от 1 до 4 атомов углерода. Предпочтительно заместители для вышеописанных необязательно замещенных алкила, алкенила, алкинила, циклического алкила, циклического алкенила, циклического алкинила, карбоциклила, арила, гетероциклила и гетероарила включают галоген, -CN, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, арил, гетероарил, гетероциклил, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ и $-SO_3M$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Стереохимические определения и правила, использованные здесь, в целом придерживаются S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения согласно изобретению могут содержать асимметрические или хиральные центры и, таким образом, существовать в разных стереоизомерных формах. Подразумевается, что все стереоизомерные формы соединений согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, равно как и их смеси, такие как рацематы, образуют часть настоящего изобретения. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, то есть обладают способностью вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения используют префиксы D и L, или R и S, для обозначения абсолютной конфигурации молекулы по отношению к ее хиральному центру (ам). Префиксы d и l или (+) и (-) используют для обозначения знака вращения плоскополяризованного света соединением, при этом (-) или l означает, что соединение левовращающее. Соединение с префиксом (+) или d - правовращающее. Для заданной химической структуры эти стереоизомеры идентичны, за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Конкретный стереоизомер может также быть обозначен как энантиомер, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, и может быть получена при отсутствии стереоселективности или стереоспецифичности химической реакции или процесса. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" обозначают эквимолярную смесь двух энантиомерных видов, не обладающую оптической активностью.

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

Термин "пролекарство" в контексте данной заявки обозначает форму-предшественник или производное соединения согласно изобретению, которая способна ферментативно или гидролитически активироваться или превращаться в более активную родительскую форму; см., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, p. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), p. 247-267, Humana Press (1985). Пролекарства согласно данному изобретению включают, но не ограничиваются ими, содержащие сложные эфиры пролекарства, фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, модифицированные D-аминокислотами пролекарства, гликозилированные пролекарства, β-лактам-содержащие пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид пролекарства, 5-фторцитозиновые и другие 5-фторуридиновые пролекарства, которые могут быть преобразованы в более активное свободное цитотоксическое лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, из которых могут

быть получены пролекарства для применения в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, соединения согласно настоящему изобретению и химиотерапевтические агенты, такие как вышеописанные.

Термин "пролекарство" также подразумевает производное соединения, способное гидролизоваться, окисляться или каким-либо другим образом реагировать в биологических условиях (in vitro или in vivo) для обеспечения соединения согласно настоящему изобретению. Пролекарства могут становиться активными только после такой реакции в биологических условиях или же могут обладать активностью в непрореагировавшем виде. Примеры пролекарств, предусмотренных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, аналоги или производные соединений любой из описанных здесь формул, которые включают биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарств включают производные соединений любой из описанных здесь формул, включающие фрагменты -NO, $-NO_2$, -ONO или $-ONO_2$. Пролекарства обычно могут быть изготовлены с использованием хорошо известных методов, таких как описанные в Burger's Medicinal Chemistry и Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); см. также Goodman и Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

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

Термин "иминореагирующий реагент" относится к реагенту, способному реагировать с иминной группой. Примеры иминореагирующих реагентов включают, но не ограничиваются ими, сульфиты (H_2SO_3, H_2SO_2 или соль HSO_3^-, SO_3^{2-} или HSO_2^-образованная с катионом), метабисульфит ($H_2S_2O_5$ или соль $S_2O_5^{2-}$ образованная с катионом), моно-, ди-, три- и тетра-тиофосфаты (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 или соль PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} или PS_4^{3-} образованная с катионом), тиофосфатные сложные эфиры ($(R^iO)_2PS(OR^i)$), R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), различные амины (гидроксиламин (например, NH_2OH), гидразин (например, NH_2NH_2), $NH_2O\text{-}R^i$, $R^iNH\text{-}R^i$, $NH_2\text{-}R^i$), $NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2$, $NH_2\text{-}C(=S)\text{-}NH_2$, тиосульфат ($H_2S_2O_3$ или соль $S_2O_3^{2-}$ образованная с катионом), дитионит ($H_2S_2O_4$ или соль $S_2O_4^{2-}$ образованная с катионом), дитиофосфат ($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ или его соль, образованная с катионом), гидроксамовую кислоту ($R^kC(=O)NHOH$ или соль, образованная с катионом), гидразид ($R^kCONHNH_2$), формальдегидсульфоксилат ($HOCH_2SO_2H$ или соль $HOCH_2SO_2^-$ образованная с катионом, таким как $HOCH_2SO_2^-Na^+$), гликозилированный нуклеотид (такой как ГДФ-манноза), флударабин или их смесь, где R^i и $R^{i'}$, каждый независимо, являются линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, и замещены по меньшей мере одним заместителем, выбранным из $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ и $-PO_3H$; R^i и $R^{i'}$ могут быть дополнительно замещены заместителем для описанного здесь алкила; R^j является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода; и R^k является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероциклилом или гетероарилом (предпочтительно R^k является линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода; более предпочтительно R^k является метилом, этилом или пропилом). Предпочтительно катион является одновалентным катионом, таким как Na^+ или K^+. Предпочтительно иминореагирующий реагент выбран из сульфитов, гидроксиламина, мочевины и гидразина. Более предпочтительно иминореагирующий реагент является $NaHSO_3$ или $KHSO_3$.

Здесь и далее, если не указано иное, термины "биогидролизуемый амид", "биогидролизуемый сложный эфир", "биогидролизуемый карбамат", "биогидролизуемый карбонат", "биогидролизуемый уреид" и "биогидролизуемый фосфатный аналог" означают амид, сложный эфир, карбамат, карбонат, уреид или фосфатный аналог соответственно, которые либо 1) не лишают соединение биологической активности и предоставляют ему полезные свойства in vivo, такие как усвоение, длительность действия или начало действия; или 2) сами по себе биологически неактивны, но in vivo преобразуются в биологически активно соединение. Примеры биогидролизуемых амидов включают, но не ограничиваются ими, низшие алкиламиды, амиды α-аминокислот, алкоксиациламиды и алкиламиноалкилкарбониламиды. Примеры биогидролизуемых сложных эфиров включают, но не ограничиваются ими, низшие алкилэфиры, алкоксиацилоксиэфиры, алкилациламиноалкилэфиры и холиновые эфиры. Примеры биогидролизуемых карбаматов включают, но не ограничиваются ими, низшие алкиламины, замещенные этилендиамины, аминокислоты, гидроксиалкиламины, гетероциклические и гетероароматические амины и полиэфирные амины. Особенно предпочтительными пролекарствами и солями пролекарств являются те, которые увеличивают биодоступность соединений согласно изобретению при введении таких соединений млекопи-

тающим.

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

Если соединение по изобретению представляет собой основание, то желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим способом, доступным в данной области, например обработка свободного основания неорганической кислотой, такой как соляная кислота, бромоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и и т.п., или органической кислотой, такой как уксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидиловые кислоты, такие как глюкуроновая кислота или галактуроновая кислота, альфа-гидроксикислоты, такие как лимонная кислота или винная кислота, аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматические кислоты, такие как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфокислоты или этансульфоновая кислота, или им подобные.

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

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

Термины "аномальный рост клеток" и "пролиферативное расстройство" в настоящей заявке используются взаимозаменяемо. "Аномальный рост клеток" здесь и далее, если не указано иное, обозначает рост клеток, не зависящий от нормальных регуляторных механизмов (то есть потерю контактного торможения). Это включает, например, аномальный рост (1) опухолевых клеток (опухолей), которые пролиферируют путем экспрессии мутантной тирозинкиназы или сверхэкспрессии рецепторной тирозинкиназы; (2) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний, при которых происходит активация аберрантной тирозинкиназы; (3) любых опухолей, которые пролиферируют посредством рецепторных тирозинкиназ; (4) любых опухолей, которые пролиферируют путем нарушенной активации серин/треонинкиназы; и (5) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний, при которых происходит нарушенная активация серин/треонинкиназы.

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

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

"Химиотерапевтическое вещество" является химическим соединением, полезным при лечении рака.

"Метаболит" является продуктом, полученным при метаболизме в организме конкретного соединения, его производного, его конъюгата или его соли. Метаболиты соединения, его производного или его конъюгата могут быть определены с помощью обычных методов, известных в данной области техники, а

их активность определена с помощью тестов, таких как описанные в настоящем документе. Такие продукты могут произойти, например, от окисления, гидроксилирования, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления и т.п. вводимого соединения. Соответственно настоящее изобретение включает метаболиты соединений, их производных или конъюгатов согласно изобретению, включая соединения, их производные или их конъюгаты, полученные способом, включающим контакт соединения, его производного или конъюгата согласно настоящему изобретению с млекопитающим в течение периода времени, достаточного с получением его метаболического продукта.

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

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

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

Термин "бифункциональный сшивающий агент", "бифункциональный линкер" или "сшивающие агенты" обозначает модифицирующие вещества, обладающие двумя реакционноспособными группами; одна из них способна реагировать со связывающимся с клетками агентом, в то время как другая реагирует с цитотоксическим соединением для связывания двух фрагментов воедино. Подобные бифункциональные сшиватели хорошо известны в данной области (см., например, Isalm и Dent в Bioconjugation глава 5, с. 218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Например, бифункциональные сшивающие агенты, которые обеспечивают соединение через тиоэфирную связь, включают N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК) для введения малеимидных групп, или N-сукцинимидил-4-(иодацетил)аминобензоат (СИАБ) для введения иодацетильных групп. Другие бифункциональные сшивающие агенты, которые вводят в связывающийся с клетками агент малеимидные группы или галоацетильные группы, хорошо известны в данной области (см. патентные заявки США 2008/0050310, 20050169933, доступны от Pierce Biotechnology Inc. PO Box 117, Rockland, IL 61105, США) и включают, но не ограничиваются ими, бис-малеимидополиэтиленгликоль (БМПЭО), $БМ(ПЭО)_2$, $БМ(ПЭО)_3$, N-(β-малеимидопропилокси)сукцинимидный сложный эфир (BMPS), γ-малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый сложный эфир (GMBS), ε-малеимидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (EMCS), 5-малеимидовалериановой кислоты N-ГСЭ, HBVS, N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS), 4-(4-N-малеимидофенил)гидразид или гидрохлорид масляной кислоты (MPBH), N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), N-сукцинимидил йодоацетат (SIA), к-малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый сложный эфир (KMUA), N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)-бутират (SMPB), сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), сукцинимидил-(4-винилсульфонил)бензоат (SVSB), дитио-бис-малеимидоэтан (DTME), 1,4-бис-малеимидобутан (BMB), 1,4-бис-малеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDB), бис-малеимидогексан (BMH), бис-малеимидоэтан (BMOE), сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), сульфосукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоат (сульфо-SIAB), м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-MBS), N-(γ-малеимидобутрилокси)сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-GMBS), N-(ε-малеимидокапроилокси)сульфосукцимидный эфир (сульфо-EMCS), N-(к-малеимидоундеканоилокси)сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-KMUS) и сульфосукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-SMPB).

Гетеробифункциональные сшивающие агенты являются бифункциональными сшивающими аген-

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

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

"Линкер", "линкерный фрагмент" или "соединительная группа" здесь обозначает фрагмент, соединяющий вместе две группы, такие как связывающийся с клетками агент и цитотоксическое вещество. Обычно линкер в существенной степени инертен в условиях, для которых связаны две соединяемые им группы. Бифункциональный сшивающий агент может содержать две реакционноспособные группы, по одной на каждом конце линкерного фрагмента, таким образом, что одна реакционноспособная группа может сначала прореагировать с цитотоксическим соединением с получением соединения, несущего линкерный фрагмент, и вторая реакционноспособная группа может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом. Альтернативно, один конец бифункционального сшивающего агента может сначала прореагировать со связывающимся с клетками агентом с получением вещества, несущего линкерный фрагмент, и вторая реакционноспособная группа может затем реагировать с цитотоксическим соединением. Линкерный фрагмент может содержать химическую связь, позволяющую высвобождение цитотоксического фрагмента в определенном месте. Подходящие химические связи хорошо известны в данной области техники и включают дисульфидные связи, тиоэфирные связи, кислотно-лабильные связи, фотолабильные связи, пептидазо-лабильные связи и эстеразо-лабильные связи (см., например, патенты США 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 и 7414073). Предпочтительны дисульфидные связи, тиоэфирные и пептидазо-лабильные связи. Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают нерасщепляемые линкеры, такие как описанные в публикации патентной заявки США № 20050169933, или же заряженные или гидрофильные линкеры, описанные в документах US 2009/0274713, US 2010/01293140 и WO2009/134976, каждая из которых положительным образом включена в настоящее описание посредством ссылки.

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

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{26}=CR_{27})$_{m'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$(алкинил)$_{n'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пиперазино)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пирроло)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-O($CR_{20}R_{21}$)$_m$A"$_{m"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{26}=CR_{27})$_{m'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$(алкинил)$_{n'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пиперазино)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пирроло)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-S($CR_{20}R_{21}$)$_m$A"$_{m"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{26}=CR_{27})$_{m'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''
($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$(алкинил)$_{n'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$-
(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пиперазино)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$
(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пирроло)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$-
(CO)$_t$X'',

-NR_{33}(C=O)$_{p"}$($CR_{20}R_{21}$)$_m$A"$_{m"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$
(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{26}=CR_{27})$_{m'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(алкинил)$_{n'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(пиперазино)$_{t'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$A"$_{m"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{29}=N-NR_{30})$_{n"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{29}=N-NR_{30})$_{n"}$(CR_{26}=CR_{27})$_{m'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''
($CR_{24}R_{25}$)$_q$(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{29}=N-NR_{30})$_{n"}$(алкинил)$_{n'}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''
($CR_{24}R_{25}$)$_q$-(CO)$_t$X'',

-($CR_{20}R_{21}$)$_m$(CR_{29}=N-NR_{30})$_{n"}$A"$_{m"}$($CR_{22}R_{23}$)$_n$(OCH_2CH_2)$_p$($CR_{40}R_{41}$)$_{p"}$Y''($CR_{24}R_{25}$)$_q$
(CO)$_t$X'',

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

t, m", n" и p" являются 0 или 1;

X" выбран из OR_{36}, SR_{37}, $NR_{38}R_{39}$, где R_{36}, R_{37}, R_{38}, R_{39} являются H, или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, имеющим от 1 до 20 атомов углерода и/или полиэтиленгликолевой единицей -$(OCH_2CH_2)_n$, R_{37}, необязательно, является тиольной защитной группой при t = 1, COX" образует реакционноспособный сложный эфир, выбранный из N-гидроксисукцинимидных эфиров, N-гидроксифталимидных эфиров, N-гидроксисульфосукцинимидных эфиров, п-нитрофенильных эфиров, динитрофенильных эфиров, пентафторфенильных эфиров и их производных, где указанные производные облегчают образование амидной связи;

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

если Y" не является S-S и t = 0, то X" выбран из малеимидной группы, галоацетильной группы или SR_{37}, где R_{37} определен так же, как выше.

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

R_{20}, R_{21}, R_{22}, R_{23}, R_{24}, R_{25}, R_{26} и R_{27} являются одинаковыми или разными и являются -H или линей-

ным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 5 атомов углерода;

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

R_{33} является -H или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 12 атомов углерода, полиэтиленгликолевой единицей $R-(OCH_2CH_2)_n-$, или R_{33} является $-COR_{34}$, $-CSR_{34}$, $-SOR_{34}$, или $-SO_2R_{34}$, где R_{34} является H или линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 20 атомов углерода, полиэтиленгликолевой единицей $-(OCH_2CH_2)_n$; и

один из R_{40} и R_{41} необязательно является отрицательно или положительно заряженной функциональной группой, а другой является H или алкилом, алкенилом, алкинилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода.

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

Термин "аминокислота" обозначает аминокислоты естественного происхождения или аминокислоты неестественного происхождения. В одном варианте реализации аминокислота описана как $NH_2-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)OH$, где R^{aa} и $R^{aa'}$, каждый независимо, являются H, необязательно замещенным линейным, разветвленным или циклическим алкилом, алкенилом или алкинилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, арилом, гетероарилом или гетероциклилом, или же R^{aa} и N-конечный атом азота могут вместе образовывать гетероциклическое кольцо (например, как в пролине). Термин "аминокислотный остаток" обозначает соответствующий остаток, когда один атом водорода устранен с аминного и/или карбоксильного конца аминокислоты, такой как $-NH-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)O-$.

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

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

Цитотоксические соединения.

В первом варианте реализации настоящее изобретение относится к цитотоксическим соединениям, описанным в данном документе (например, соединения структурных формул (I)-(V) или (VI) или их фармацевтически приемлемые соли). В некоторых вариантах реализации цитотоксическое соединение представлено структурной формулой (I) или ее фармацевтически приемлемой солью.

В некоторых вариантах реализации для структурных формул (I)-(VI) один из L', L" и L'" представлен формулой (A), а другие, каждый независимо, представляют собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, галоген, -OH, (C_1-C_6)алкокси, или $-NO_2$. Более конкретно, один из L', L" и L'" представлен формулой (A), а другие представляет собой -H.

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

Во втором конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) R_x является линейным, разветвленным или циклическим алкилом, имеющим от 1 до 6 атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой, гало(C_1-C_3)алкилом, заряженным заместителем или ионизируемой группой Q; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или для первого конкретного варианта реализации.

В некоторых вариантах реализации Q является I) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, или $-Z'-NR_{11}R_{12}$, или их фармацевтически приемлемой солью либо II) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ или $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, не-

обязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14}-R_{16}, каждый независимо, представляют собой необязательно замещенный алкил и X^- представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для второго конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q является $-SO_3H$ или его фармацевтически приемлемой солью.

В третьем конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) J представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из NHR^{c1}, -COOH и -COE, где -COE представляет реакционноспособный сложный эфир и R^{c1} является -H или линейным или разветвленным алкилом, имеющим от 1 до 4 атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH или (C_1-C_3)алкокси; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации, первого конкретного варианта реализации или второго конкретного варианта реализации.

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

В четвертом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) L' представлен следующей формулой:

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (B1);$$

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (B2);$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (C1);\ \text{или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (C2),$$

где J представляет собой -COE;

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

m равен целому числу от 1 до 6;

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

Cy является циклическим алкилом, имеющим от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенных галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго или третьего конкретных вариантов реализации.

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

В пятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) L' описан следующей формулой:

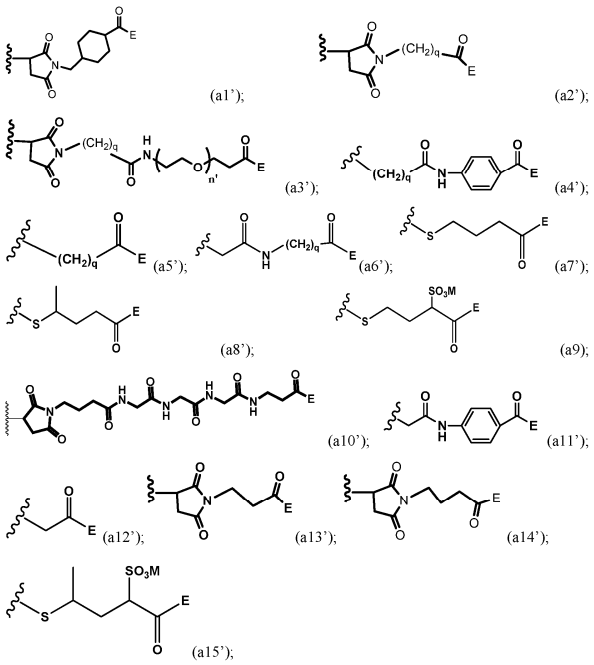
$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (B3);\ \text{или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (C3),$$

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

m равен целому числу от 1 до 6;

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



где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

M представляет собой катион (например, H^+, Na^+ или K^+);

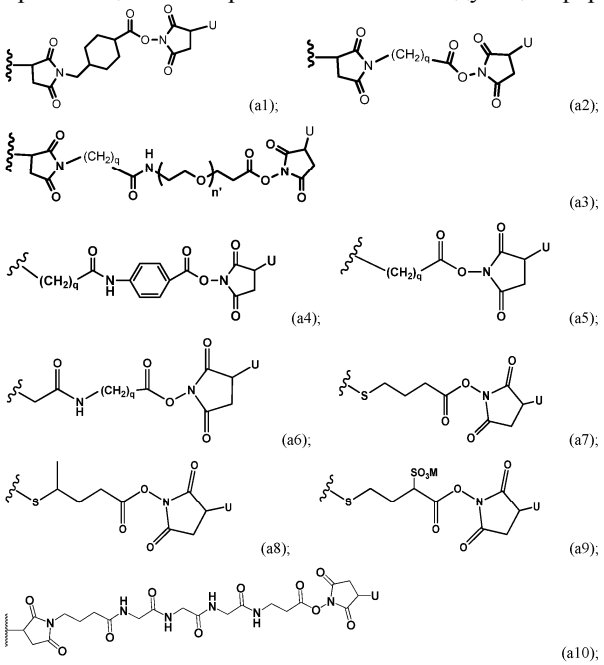
R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила (например, 2 или 4-нитрофенил), динитрофенила (например, 2,4-динитрофенил), карбоксинитрофенила (например, 3-карбокси-4-нитрофенил), пиридила или нитропиридила (например, 4-нитропиридила);

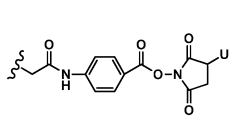
R^{d1} представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода;

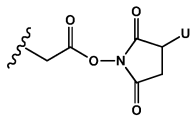
а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего или четвертого конкретных вариантов реализации.

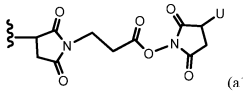
В одном варианте реализации Z^s представляет собой -H. В другом варианте реализации Z^s представляет собой -SMe или -SPy (Py - пиридил).

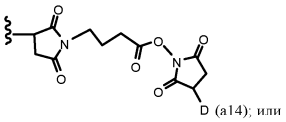
В еще одном варианте реализации Z^s выбран из любой из следующих формул:

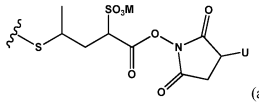



(a11);


(a12);


(a13);


D (a14); или


(a15);

где U представляет собой -H или $-SO_3M$;

а другие переменные такие же, как описано выше для формул (a1')-(a15').

В некоторых вариантах реализации заряженный заместитель или ионизируемая группа Q представляет собой I) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, или $-Z'-NR_{11}R_{12}$, или их фармацевтически приемлемую соль либо II) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ или $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14}-R_{16}, каждый независимо, представляют собой необязательно замещенный алкил и X^- представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой $-SO_3H$ или его фармацевтически приемлемую соль.

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

В некоторых вариантах реализации $-(CR_aR_b)_m-$ представляет собой $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ и m'' равен целому числу от 1 до 5; другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

В шестом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) P является пептидом, содержащим от 2 до 10 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого или пятого конкретных вариантов реализации.

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

В некоторых вариантах реализации P выбран из

Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala;

другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

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

В седьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) двойная линия ⚌ между N и C представляет двойную связь; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого или шестого конкретных вариантов реализации.

В восьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) двойная линия ⚌ между N и C представляет двойную связь, X представляет собой -H или аминозащитную группу; и Y выбран из -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", необязательно замещенного 5-6-членного азотсодержащего гетероцикла, $-SO_3H$, $-SO_2H$ и $-OSO_3H$; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого конкретных вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации Y выбран из -H, $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt или -NHOH, где M представляет собой -H, Na^+ или K^+; другие переменные такие же, как описано выше для седьмого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Y представляет собой -H, $-SO_3M$ или -OH.

В девятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) X' выбран из группы, состоящей из -H, -OH, необязательно замещенного линейного, разветвленного или циклического алкила, алкенила или алкинила, имеющего от 1 до 10 атомов углерода, и фенила; другие переменные такие же,

как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого или восьмого конкретных вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации X' представляет собой -H, -OH, (C_1-C_3)алкил, гало(C_1-C_3)алкил или фенил; другие переменные такие же, как описано выше для девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, X' представляет собой -H, -OH или -Me. Еще более конкретно X' представляет собой -H.

В десятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) Y' представляет собой -H, оксогруппу, (C_1-C_3)алкил или гало(C_1-C_3)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого или девятого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, Y' представляет собой -H или оксогруппу. Еще более конкретно Y' представляет собой H.

В одиннадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI), A и A' являются одинаковыми или разными и выбраны из -O-, -S-, -NR_5- и оксогруппы -(C=O)-; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, A и A' являются одинаковыми или разными и выбраны из -O- или -S-Еще более конкретно A и A' представляют собой -O-.

В двенадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI), R_6 представляет собой -OMe; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или одиннадцатого конкретных вариантов реализации.

В тринадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI), R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' представляют собой независимо -H, галоген, -NO_2, -OH, (C_1-C_3)алкил, гало(C_1-C_3)алкил или (C_1-C_3)алкоксигруппу; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или двенадцатого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' все представляют собой -H.

В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) R, R', R" и R_5, каждый независимо, представляют собой -H или (C_1-C_3)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого конкретных вариантов реализации.

В пятнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I)-(VI) двойная линия ⚌ между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой -H, а если это одинарная связь, то X представляет собой -H, Y представляет собой -OH или -SO_3M;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' все представляют собой -H;

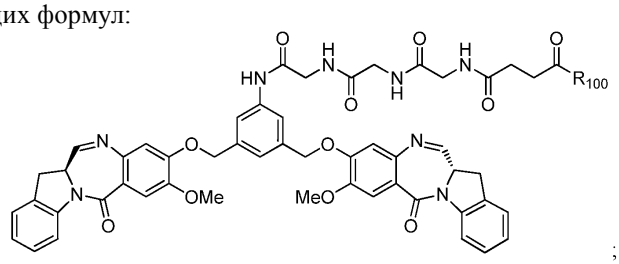
R_6 представляет собой -OMe;

X' и Y', оба, представляют собой -H;

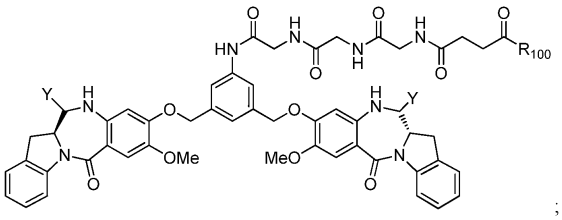
A и A' представляют собой -O-;

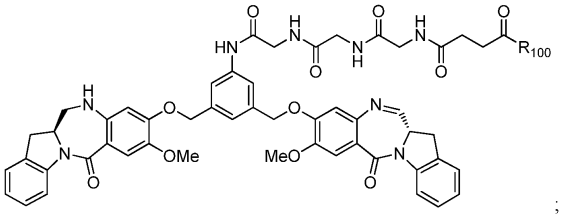
M представляет собой H, Na^+ или K^+; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого конкретных вариантов реализации.

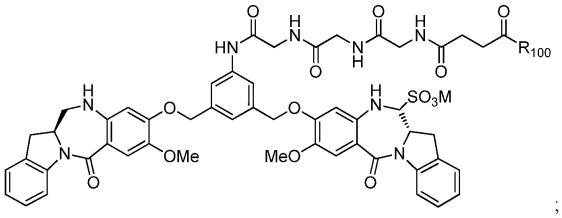
В шестнадцатом конкретном варианте реализации цитотоксическое соединение согласно изобретению выбрано из следующих формул:

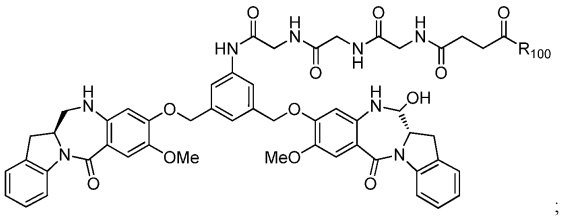


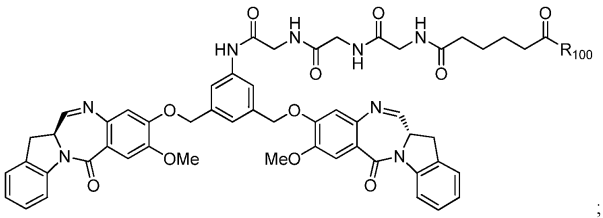
;

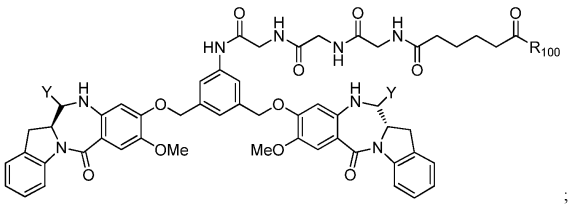

;

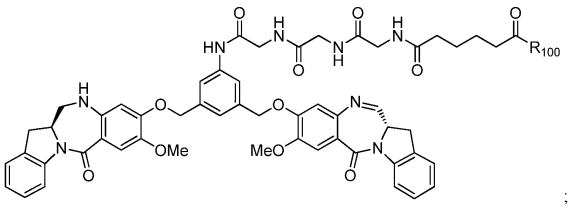

;

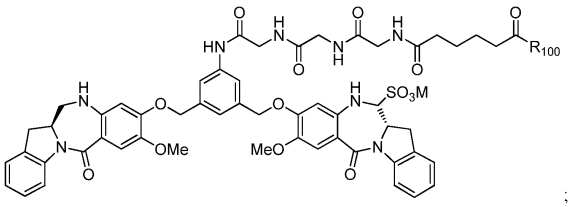

;

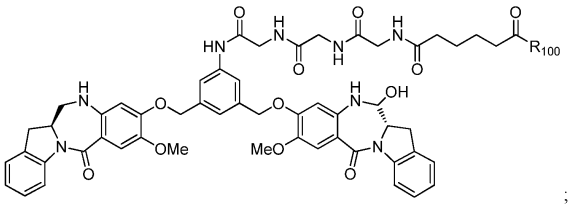

;

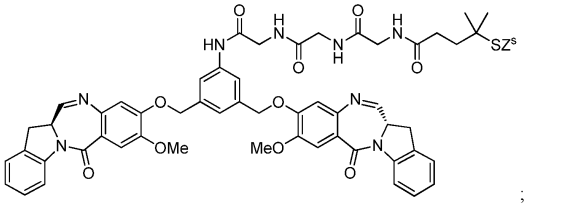

;

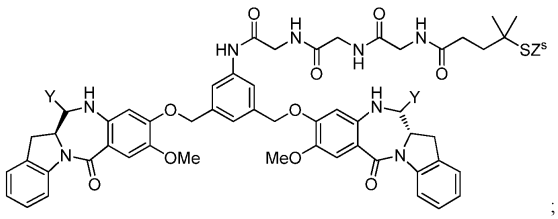

;

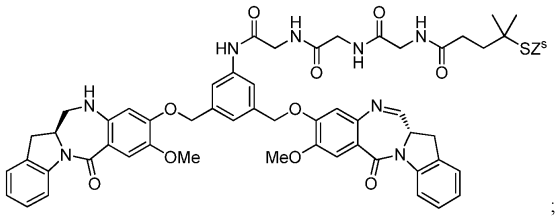

;

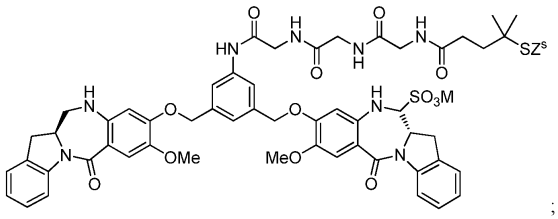

;

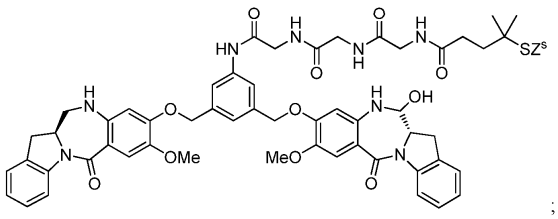

;

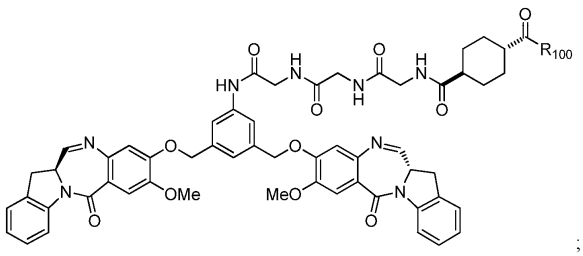

;

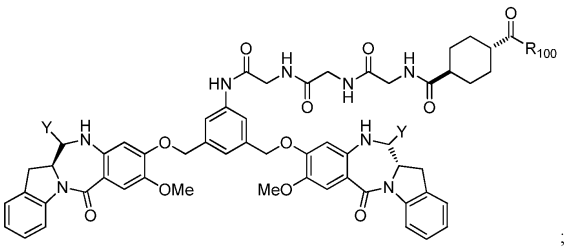

;

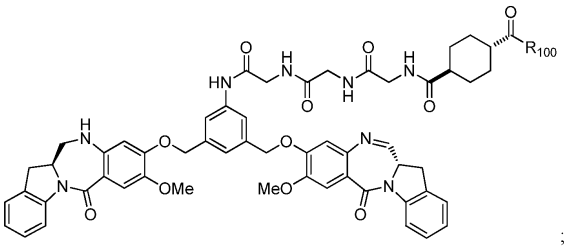

;

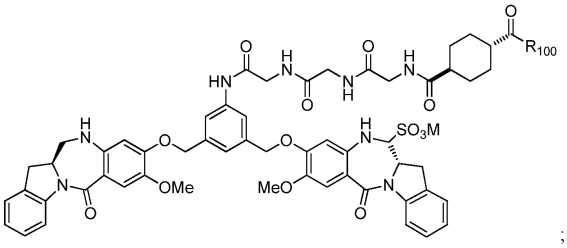

;

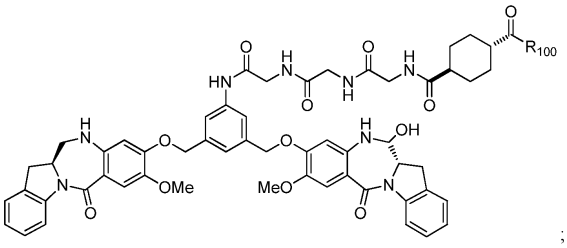

;

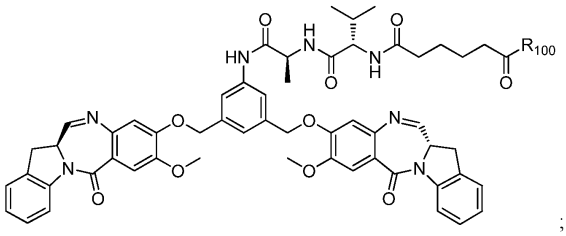

;

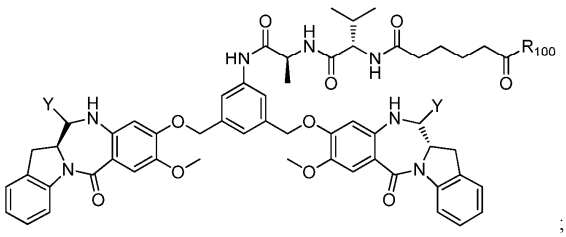

;

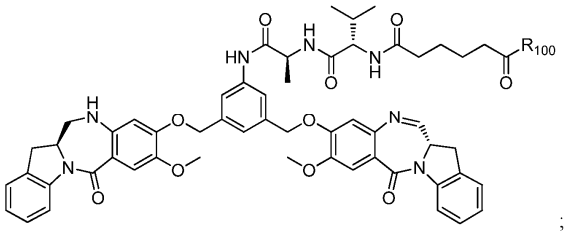

;

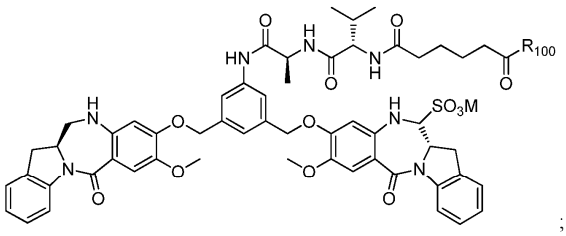

;

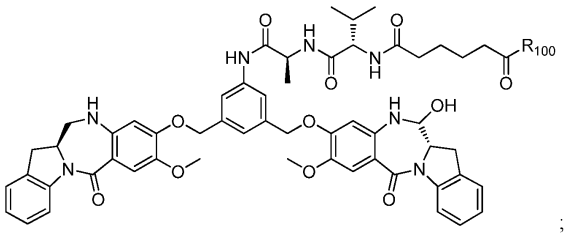

;

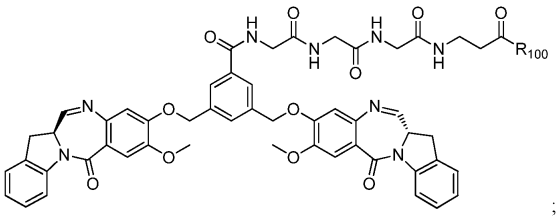

;

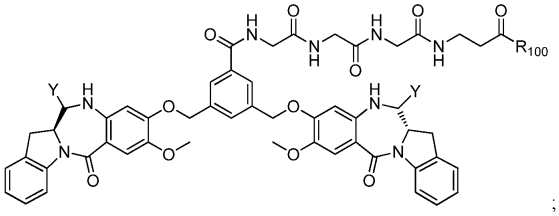

;

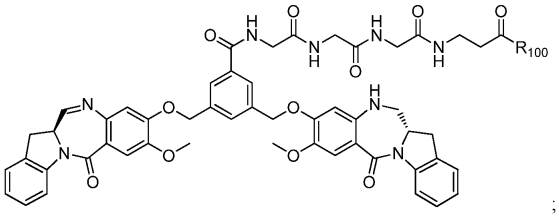

;

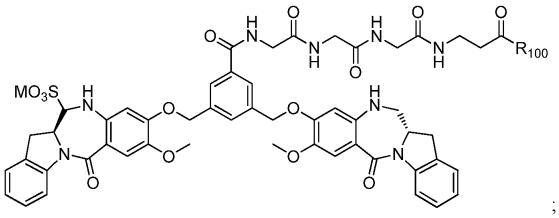

;

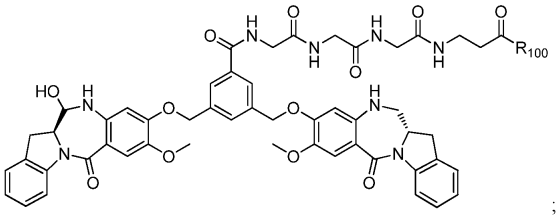

;

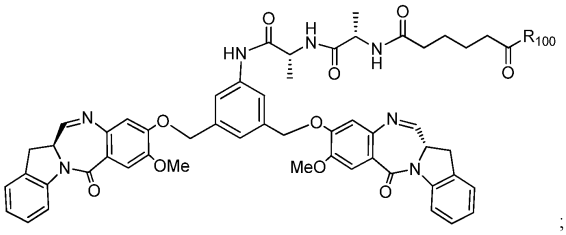

;

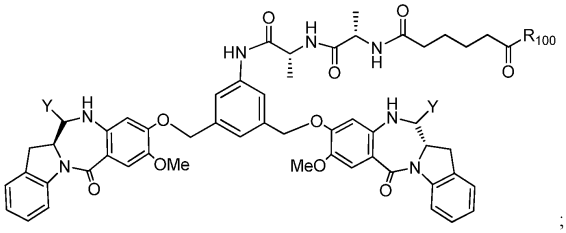

;

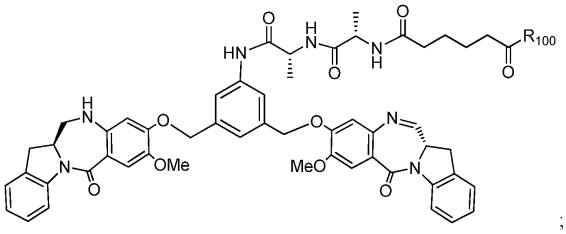

;

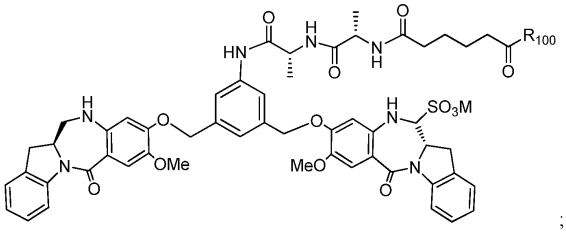

;

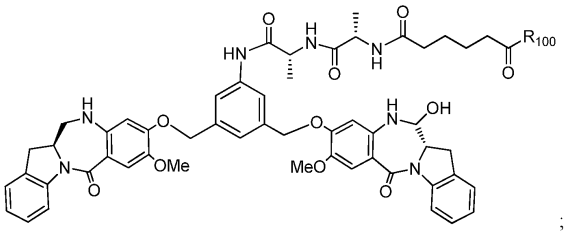

;

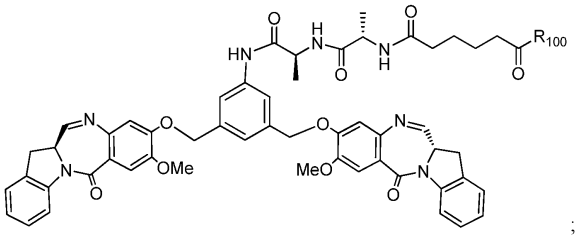

;

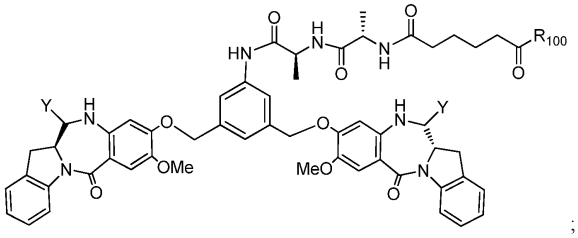

;

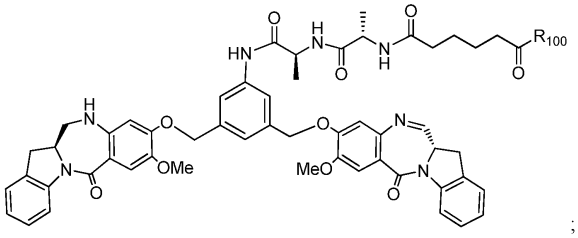

;

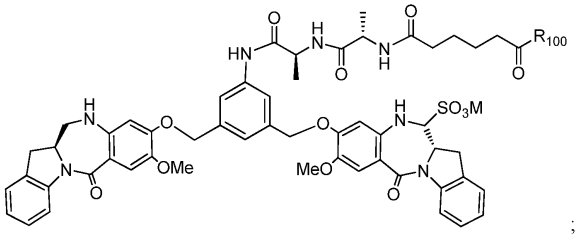

;

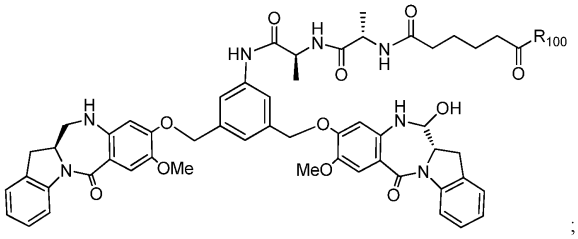

;

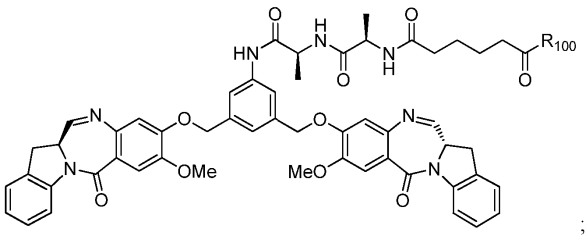

;

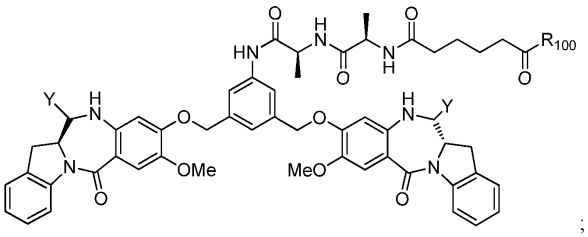

;

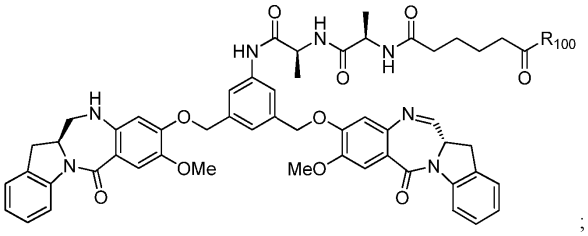

;

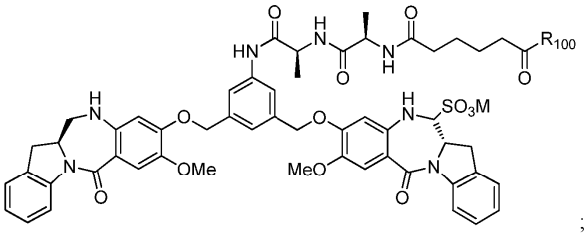

;

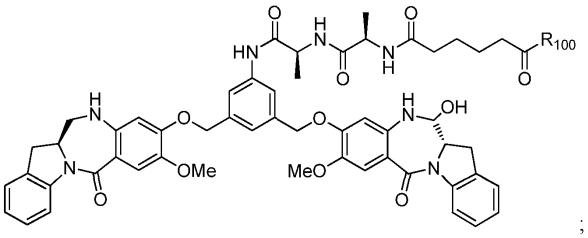

;

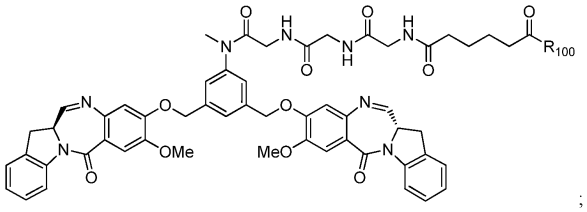

;

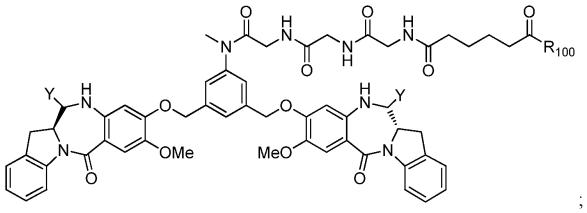

;

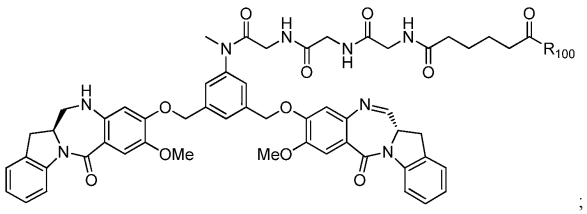

;

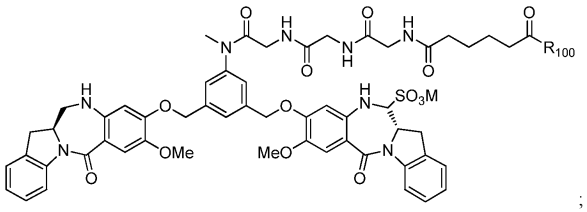

;

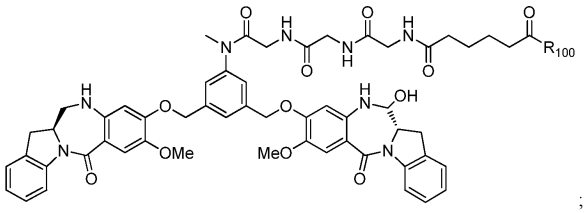

;

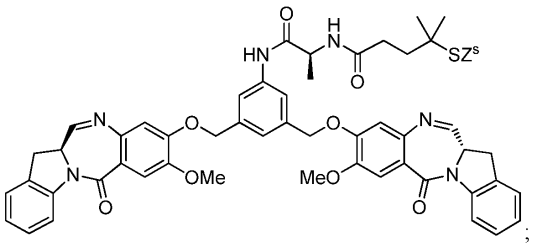

;

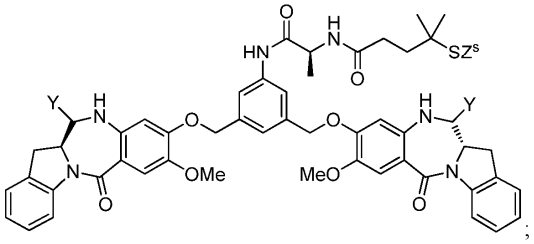

;

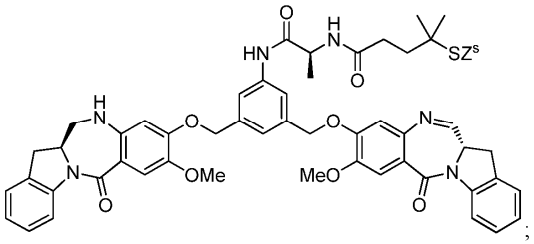

;

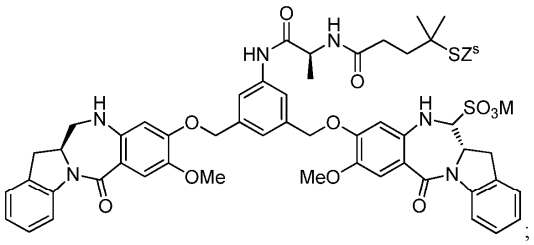

;

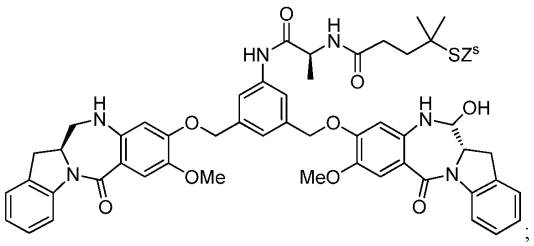

;

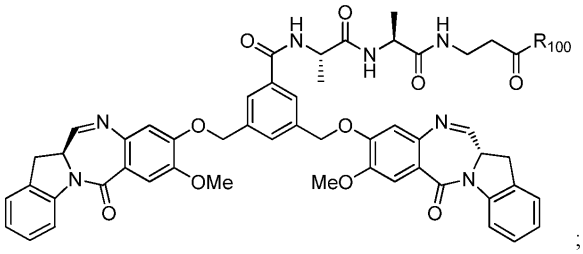

;

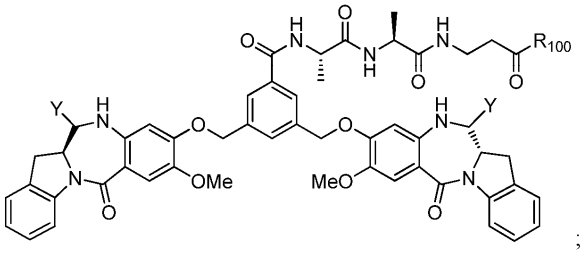

;

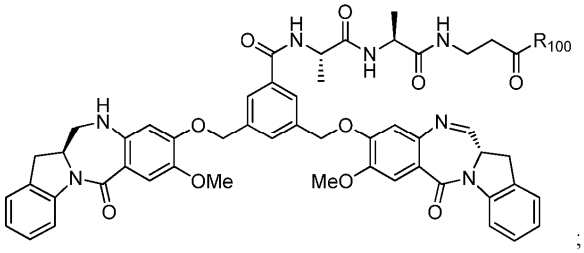

;

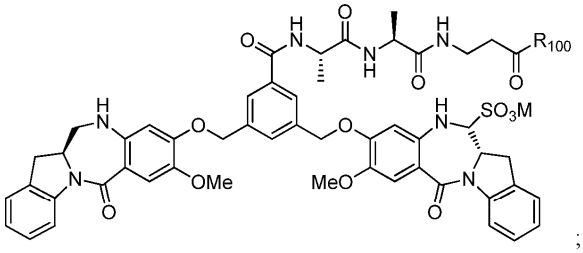

;

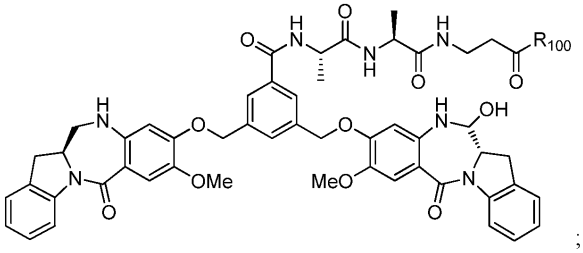

;

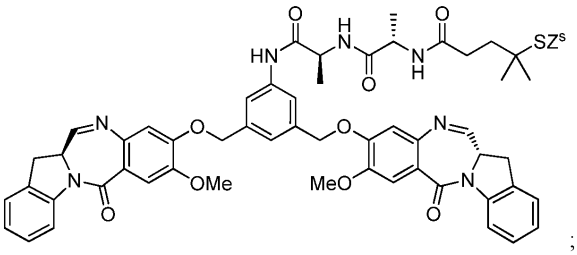

;

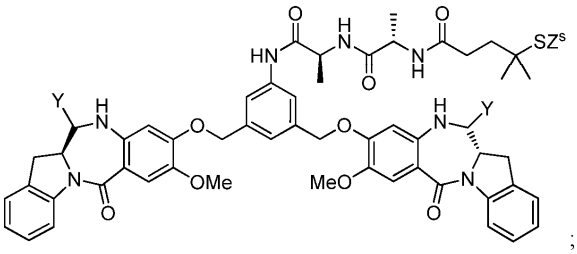

;

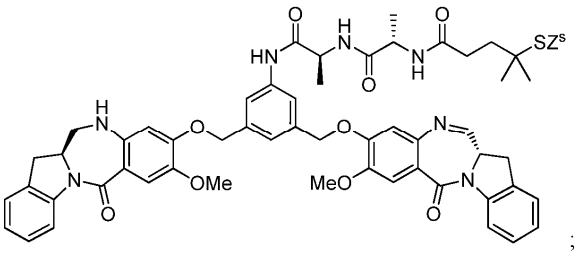

;

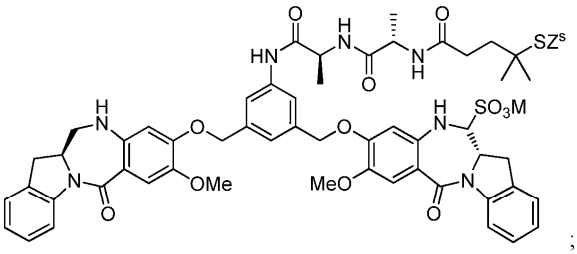

;

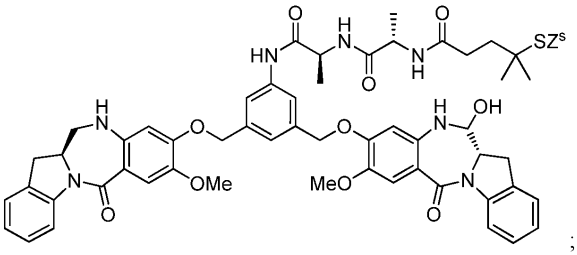

;

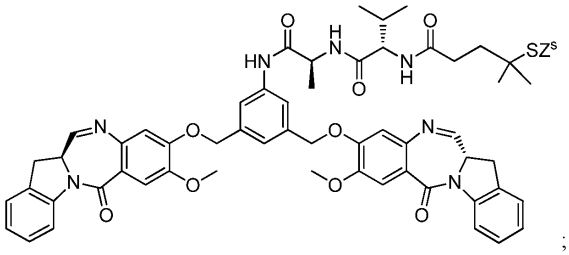

;

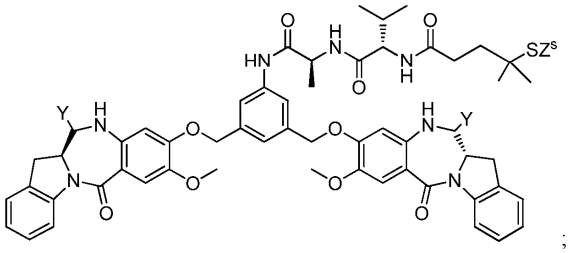

;

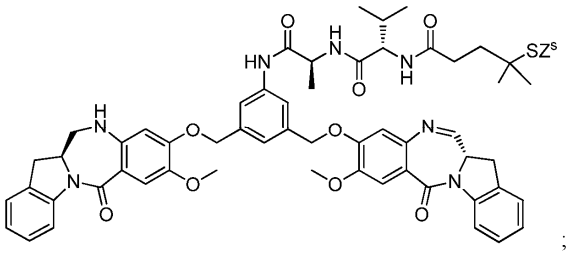

;

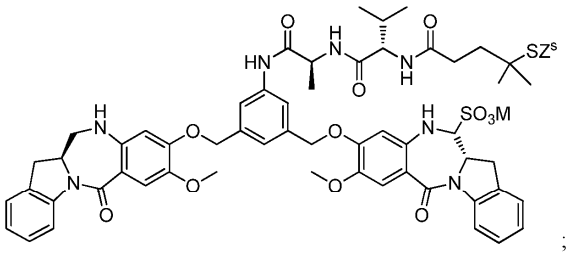

;

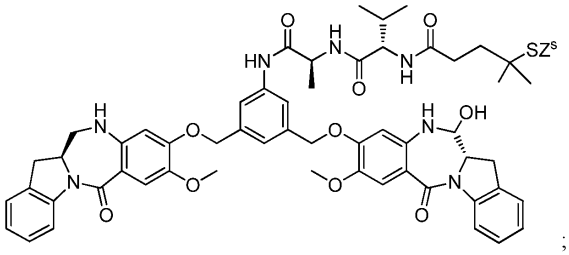

;

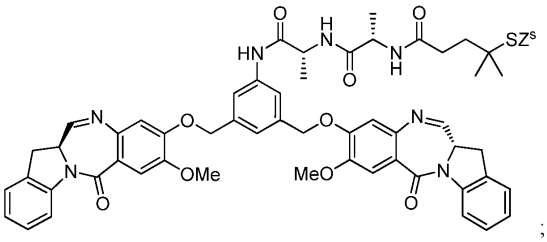

;

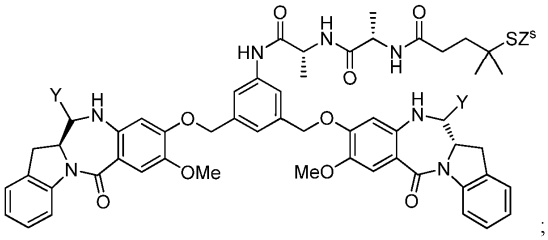

;

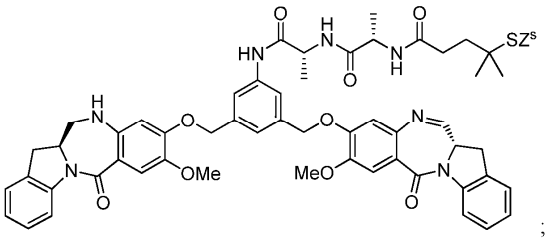

;

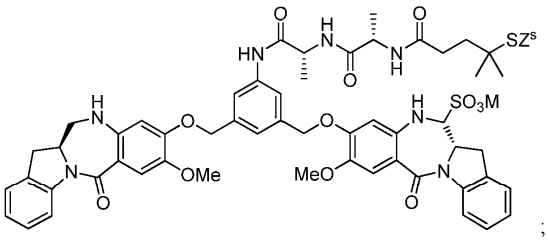

;

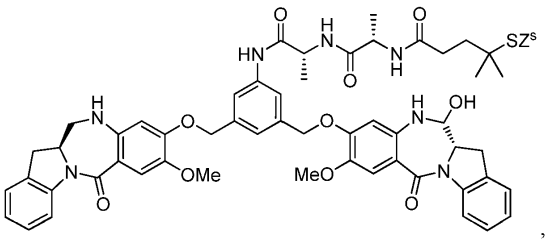

;


;


;


;


; или


,

или его фармацевтически приемлемой соли,

где R_{100} представляет собой -OH, -OMe или .

Y представляет собой -H, -OH или $-SO_3M$ и

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

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

В конкретном варианте реализации Z^s выбран из описанных выше формул (a')-(a15').

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

В другом конкретном варианте реализации Z^s представляет собой -H.

В другом конкретном варианте реализации Y представляет собой $-SO_3M$. Альтернативно, Y представляет собой -OH.

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

Синтез цитотоксических соединений

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

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

Связывающиеся с клетками агенты.

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

Подбор подходящего связывающегося с клетками агента является вопросом выбора, который частично зависит от конкретного варианта таргетной клеточной популяции, однако во многих (но не всех) случаях человеческие моноклональные антитела являются хорошим выбором, если доступен их надлежащий вид. Например, моноклональное антитело MY9 представляет собой мышиное антитело IgG_1, которое специфически связывается с антигеном CD33 (J.D. Griffin et al., Leukemia Res., 8:521 (1984)), и может быть использовано, если клетки-мишени экспрессируют CD33, как при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ).

В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент не является белком. Например, в некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент может быть витамином, связывающимся с витаминовым рецептором, таким как рецептор на клеточной поверхности. В этом отношении витамин А связывается с ретинол-связывающим белком (РСБ) с образованием комплекса, который, в свою очередь, связывает рецептор STRA6 с высокой аффинностью и увеличивает всасывание витамина А. В другом примере фолиевая кислота/фолат/витамин B_9 связывает фолатный рецептор на поверхности клетки (FR), например FRα, с высокой аффинностью. Фолиевая кислота или антитела, которые связываются с FRα, могут быть использованы для нацеливания на фолатные рецепторы, экспрессированные на опухолях яичников и других опухолях. Кроме того, витамин D и его аналог связываются с рецептором витамина D.

В других вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой белок или полипептид, или соединение, содержащее белок или полипептид, в том числе антитело, белок - не антитело или полипептид. Предпочтительно белок или полипептиды содержат один или несколько остатков Lys в $-NH_2$ группе боковой цепи. $-NH_2$ группы боковой цепи Lys могут быть ковалентно связаны с бифункциональными сшивающими агентами, которые, в свою очередь, связаны с димерными соединениями согласно настоящему изобретению, таким образом конъюгируя связывающиеся с клетками агенты с димерными соединениями согласно настоящему изобретению. Каждое связывающийся с клетками агент на основе белка может содержать несколько $-NH_2$ групп боковой цепи Lys, доступных для связывания соединений согласно изобретению с помощью бифункциональных сшивающих агентов.

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

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

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

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

В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой гуманизированное антитело, гуманизированное одноцепочечное антитело или фрагмент гуманизированного антитела (или "антиген-связывающий фрагмент"). В конкретном варианте реализации гуманизированное ан-

титело представляет собой huMy9-6 или другое родственное антитело, которое описано в патентах США №№ 7342110 и 7557189. В другом конкретном варианте реализации гуманизированное антитело представляет собой антитело против рецептора фолиевой кислоты, описанное в предварительных заявках США №№ 61/307797, 61/346595 и 61/413172 и заявке на патент США № 13/033723 (опубликованной как US 2012/0009181 A1). Информация из всех этих заявок включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

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

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

Другими словами, в качестве примера связывающийся с клетками агент может включать антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент антитела, которое специфически связывается с клеткой-мишенью, моноклональное антитело, одноцепочечное моноклональное антитело, фрагмент моноклонального антитела, которое специфически связывается с клеткой-мишенью, химерное антитело, фрагмент химерного антитела, который специфически связывается с клеткой-мишенью, биспецифическое антитела, доменное антитело, фрагмент антитела, домен, который специфически связывается с клеткой-мишенью, интерферон (например, α, β, γ), лимфокин (например, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4 и ИЛ-6), гормон (например, инсулин, высвобождающий тиротропин гормон (ВТГ), стимулирующий меланоциты гормон (МСГ) и стероидный гормон (например, андроген и эстроген), витамин (например, фолат), фактор роста (например, EGF, TGF-альфа, FGF, VEGF), колониестимулирующий фактор, молекула транспорта питательных веществ (например, трансферрин; см. O'Keefe et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:932-937, включенный в данное описание посредством ссылки), центирин (белковый каркас на основе консенсусной последовательности повторов фибронектина типа III (FN3); см. публикации патентных заявок США 2010/0255056, 2010/0216708 и 2011/0274623, включенные в данное описание посредством ссылки), белок с анкириновыми повторами (например, спроектированный белок с анкириновыми повторами, известный как DARPin; см. публикации патентных заявок США 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146, и 2011/0224100, включенные в данное описание посредством ссылки, также см. C. Zahnd et al., Cancer Res. (2010) 70:1595-1605; Zahnd et al., J. Biol. Chem. (2006) 281(46):35167-35175; и Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., Nature Biotechnology (2005) 23:1257-1268, включенные в данное описание посредством ссылки), белок или синтетический пептид с анкириноподобными повторами (см., например, публикации патентных заявок США 2007/0238667; патент США № 7101675; WO2007/147213 и WO2007/062466, включенные в данное описание посредством ссылки), аднектин (каркасный белок домена фибронектина; см. публикации патентных заявок США 2007/0082365; 2008/0139791, включенные в данное описание посредством ссылки), авитело (включая диатела, триатела и тетратела; см публикации патентных заявок США 2008/0152586 и 2012/0171115), переориентирующиеся молекулы с двойным рецептором (DART) (P.A. Moore et al., Blood, 2011; 117(17):4542-4551; Veri M.C., et al., Arthritis Rheum, 2010 Mar 30; 62(7): 1933-43; Johnson S., et al. J Mol Biol, 2010 Apr 9; 399(3):436-49), проникающих в клетку перегруженных белков (Methods in Enzymol. 502, 293-319 (2012), и других клеточносвязывающих молекул или веществ.

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

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

Конкретные примеры антигенов или лигандов могут включать в себя ренин; гормон роста (например, человеческий гормон роста и бычий гормон роста); гормон роста рилизинг-фактора; паратиреоидный гормон; тиреотропный гормон; липопротеин; альфа-1-антитрипсин; A-цепь инсулина; B-цепь инсулина; проинсулин; фолликул-стимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; фактор свертывания крови (например, фактор VMC, фактор IX, тканевый фактор и фактор фон Виллебранда); антифактор свертывания крови (например, протеин C); предсердный натрийуретический фактор; поверхностно-активное вещество легкого; активатор плазминогена (например, урокиназа, моча человека или активатор плазминогена тканевого типа); бомбезин; тромбин; гемопоэтический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназа; RANTES (то есть регулируемый при активации, обычно экспрессируемый и секретируемый T-клетками); человеческий макрофагальный воспалительный белок-1-альфа; сывороточный альбумин (человеческий сывороточный альбумин); мюллерово ингибирующее вещество; A-цепь релаксина; B-цепь релаксина; прорелаксин; мышиный гонадотропин-

ассоциированный пептид; микробный белок (бета-лактамаза); ДНКаза; IgE; цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген (например, CTLA-4); ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; рецептор для гормонов или факторов роста; белок A или D; ревматоидный фактор; нейротрофический фактор (например, костный нейротрофический фактор, нейротрофин-3, -4, -5 или -6), фактор роста нервов (например, NGF-β); фактор роста, полученный из тромбоцитов; фактор роста фибробластов (например, AFGF и bFGF); рецептор 2 фактора роста фибробластов; эпидермальный фактор роста; преобразующий фактор роста (например, TGF-альфа, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 и TGF-β5); инсулиноподобный фактор роста-I и -II; дез(1-3)-IGF-1 (мозговой IGF-I); белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста; меланотрансферрин; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; рецептор EPHA; рецептор EphB; рецепторфолиевой кислоты; FOLR1; мезотелин; крипто; альфа $_v$ бета$_6$; интегрины; VEGF; VEGFR; EGFR; рецептор трансферрина; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; CD белки (например, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80. CD81, CD103, CD105, CD123, CD134, CD137, CD138, CD152), один или несколько опухолеассоциированных антигенов или рецепторов на клеточной поверхности (см. публикации США 2008/0171040 или 2008/0305044, включены во всей своей полноте посредством ссылки); эритропоэтин; остеоиндуктивный фактор; иммунотоксин; костный морфогенетический белок; интерферон (например, интерферон-альфа, -бета и -гамма); колониестимулирующий фактор (например, M-CSF, GM-CSF и G-CSF); интерлейкины (например, ИЛ-1 до ИЛ-10); супероксиддисмутаза; рецептор Т-клеток; белок поверхности мембраны; фактор ускорения распада; вирусный антиген (например, часть оболочки ВИЧ); транспортный белок, рецептор самонаведения; аддрессин; регуляторный белок; интегрин (например, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM;) антиген, ассоциированный с опухолью (например, Her2, HER3 и HER4 рецептор); эндоглин; c-Met; C-kit; 1GF1R; PSGR; NGEP; PSMA; PSCA; TMEFF2; LGR5; B7H4; и фрагменты любого из перечисленных выше полипептидов.

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

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

В некоторых вариантах реализации связывающийся с клетками агент представляет собой "антиген-связывающий фрагмент" моноклонального антитела, разделяя с ним последовательности, критично важные для связывания антигена с антителом (например, huMy9-6 или родственные ему антитела, описанные в патентах США 7342110 и 7557189, включенных в настоящее описание посредством ссылки).

Здесь и далее термин "антиген-связывающий фрагмент" антитела (он же иногда взаимозаменяемо обозначен как "фрагмент антитела") охватывает один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может быть выполнена с помощью определенных фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела, включают (без ограничения): (I) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1 (например, расщепленное папаином антитело распадается на три фрагмента: два антиген-связывающих Fab-фрагмента и один фрагмент Fc, который не связывается с антигеном); (II) F(ab')$_2$ фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области (например, расщепленное пепсином антитело расщепляется на два фрагмента: бивалентный антиген-связывающий F(ab')$_2$-фрагмент и pFc'-фрагмент, который не связывает антиген) и связанная с ним F(ab') моновалентная единица; (III) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1 (то есть той части тяжелой цепи, которая включена в Fab); (IV) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, и связанный с ним дисульфидно соединенный Fv; (V) dAb (доменное антитело) или sdAb (одиночное доменное антитело) фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH; и (VI) изолированную область, определяющую комплементарность (CDR). В некоторых вариантах реализации антиген-связывающий фрагмент является sdAb (одиночным доменным антителом).

В некоторых вариантах реализации антиген-связывающий фрагмент также включает определенные

сконструированные или рекомбинантные производные (или "антитела-производные"), которые также включают один или более фрагментов антитела, сохраняющих способность специфически связываться с антигеном, в дополнение к элементам или последовательностям, которые могут не встречаться в антителах естественного происхождения.

Например, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием стандартных методов рекомбинации через синтетический линкер, который позволяет им соединяться в одну белковую цепь, в которой VL и VH области спариваются с образованием одновалентных молекул (известны как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. Science 242:423-426, 1988 и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988).

Во всех вариантах реализации, описанных в данном документе, N-конец scFv может быть доменом VH (то есть N-VH-VL-C) либо доменом VL (то есть N-VL-VH-C).

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

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

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

Все эти форматы могут состоять из вариабельных фрагментов со специфичностью к двум или более различным антигенам, и в этом случае они являются подтипами би- или мультиспецифичных антител. Например, определенные биспецифичные тандемные ди-scFv известны как биспецифичные активаторы Т-клеток (BiTE).

В некоторых вариантах реализации каждый scFv в тандемном scFv или диателo/триателo/тетратело могут иметь одинаковую или различную специфичность связывания, и каждый из них может независимо друг от друга иметь N-концевой VH или N-концевой VL.

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

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

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

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

Другим примером такого сконструированного миниатюризованного антитела является "цельное тело", в котором из молекул IgG4 удалена шарнирная область. Молекулы IgG4 нестабильны и могут обмениваться гетеродимерами легкой-тяжелой цепей друг с другом. Удаление шарнирной области полностью предотвращает спаривание тяжелой цепи с тяжелой цепью, оставляя только высокоспецифичные моновалентные гетеродимеры легкая/тяжелая цепь, сохраняя при этом Fc область, чтобы обеспечить стабильность и период полураспада in vivo.

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

Отдельные вариабельные новые антигенрецепторные доменные фрагменты антител (Vnar, или Vnar домены) ведут свое происхождение от иммуноглобулиновых новых антигенрецепторных антител (IgNAR) хрящевых рыб (например, акул). Будучи одними из самых маленьких известных белковых каркасов на основе иммуноглобулинов, такие однодоменные белки демонстрируют благоприятный размер и загадочные свойства распознавания эпитопа. Зрелые антитела IgNAR состоят из гомодимеров одного вариабельного нового антигенрецепторного домена (V_{NAR}) и пяти константных новых антигенрецепторных доменов (C_{NAR}). Эта молекула очень стабильна и обладает эффективными характеристиками связывания. Ее внутренняя стабильность, вероятно, может быть связана как с (I) подлежащим каркасом Ig, на котором есть значительное количество заряженных и гидрофильных выставленных на поверхность остатков по сравнению с доменами VH и VL обычного антитела, обнаруженных в мышиных антителах; и (II) со стабилизирующими структурными особенностями в петлях определяющих комплементарность областей (CDR), включая межпетлевые дисульфидные мостики и структуру внутрипетлевых водородных связей.

Минитело является сконструированным фрагментом антитела, содержащим scFv, связанный с доменом CH, таким как CH3γ1 (CH3 домен IgG1) или CH4ε (CH4 домен IgE). Например, специфичный по карциноэмбриональному антигену (КЭА) scFv был связан с CH3γ1 для создания минитела, которое по ранее известным данным обладало превосходным нацеливанием на опухоль в сочетании с быстрым клиренсом in vivo (Hu et al., Cancer Res. 56:3055-3061, 1996). scFv может иметь N-концевой VH или VL. Связью может служить короткий пептид (например, два аминокислотных линкера, такие как ValGlu), что приводит к нековалентному, бесшарнирному минителу. В качестве альтернативы связью может служить шарнир IgG1 и линкерный пептид GlySer, что приводит к ковалентному шарнирному минителу.

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

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

Можно также создать триспецифичные молекулы-производные антител, например, путем экспрессии биспецифичных антител с двумя различными Fab и Fc. Примером является мышиное IgG2a антитело против Ep-CAM, крысиное IgG2b антитело против CD3 в квадроме, именуемой BiUII, о котором полагают, что оно делает возможной совместную локализацию опухолевых клеток, экспрессирующих Ep-CAM,

Т-клеток, экспрессирующих CD3, и макрофагов, экспрессирующих FCγRI, таким образом усиливая костимулирующие и противоопухолевые функции иммунных клеток.

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

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

Антиген-связывающие фрагменты или производные антитела согласно настоящему изобретению могут иметь существенно одинаковые или идентичные (1) области CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи; (2) области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи и/или тяжелой цепи или (3) области легкой цепи и/или тяжелой цепи по сравнению с антителом, из которого они получены/сконструированы. Последовательности в этих областях могут содержать консервативные аминокислотные замены, в том числе замены в пределах областей CDR. В некоторых вариантах осуществления не существует больше чем 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных замен. В качестве альтернативы антиген-связывающие фрагменты или производные антитела имеют область легкой цепи и/или область тяжелой цепи, которая по меньшей мере около на 90, 95, 99 или 100% идентична антителу, из которого они получены/сконструированы. Эти антиген-связывающие фрагменты или производные антител могут иметь существенно такую же специфичность связывания и/или аффинности к антигену-мишени по сравнению с антителом. В некоторых вариантах реализации значения K_d и/или k_{off} антиген-связывающих фрагментов или производных антител находятся в пределах 10-кратной величины (выше или ниже), 5-кратной величины (выше или ниже), 3-кратной величины (выше или ниже) или 2-кратной величины (выше или ниже) от описанного здесь антитела.

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

Техники получения моноклональных антител позволяют получать чрезвычайно специфичные связывающиеся с клетками агенты в виде специфичных моноклональных антител. Особенно хорошо известны в данной области техники для создания моноклональных антител, получаемых иммунизацией мышей, крыс, хомяков или любого другого млекопитающего представляющим интерес антигеном, таким как интактные клетки-мишени, антигены, выделенные из клетки-мишени, цельные вирусы, ослабленные цельные вирусы и вирусные белки, такие как белки вирусной оболочки. Могут быть также использованы сенсибилизированные человеческие клетки. Другим методом создания моноклональных антител является использование фаговых библиотек scFv (одноцепочечной вариабельной области), а именно человеческих scFv (см., например, Griffiths et al., патенты США №№ 5885793 и 5969108; McCafferty et al., WO92/01047; Liming et al., WO99/06587). Дополнительно могут использоваться антитела с измененной поверхностью, описанные в патенте США № 5639641, как и химерные антитела и гуманизированные антитела.

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

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

Здесь и далее термины "DARPin" и "(спроектированный) белок с анкириновыми повторами" используются взаимозаменяемо для обозначения определенных генетически модифицированных белков-миметиков антитела, которые обычно показывают предпочтительное (иногда специфичное) связывание мишени. Целью может быть белок, углеводы или другие химические соединения, и аффинность связывания может быть довольно высокой. DARPin-ы могут быть получены из природных белков, содержащих анкириновые повторы, и предпочтительно состоят по меньшей мере из трех, как правило, четырех или пяти анкириновых повторяющихся мотивов (обычно около 33 аминокислотных остатков в каждом анкириновом повторяющемся мотиве) этих белков. В некоторых вариантах осуществления DARPin содержит около четырех или пяти повторов, и может иметь молекулярную массу около 14 или 18 кДа соот-

ветственно. Библиотеки белков DARPin с рандомизированными остатками потенциального взаимодействия с целью, разнообразием свыше 10^{12} вариантов, могут быть сгенерированы на уровне ДНК, для использования при выборе белков DARPin, которые связываются с желаемой целью (например, действуя в качестве агонистов или антагонистов рецептора, обратных агонистов, ингибиторов ферментов, или простых связок белка-мишени) с пикомолярной аффинностью и специфичностью, с использованием различных технологий, таких как рибосом-дисплей или фаг-дисплей с частицами распознавания сигнала (ЧРС); см., например, публикации патентных заявок США №№ 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146 и 2011/0224100, WO02/20565 и WO06/083275 касательно приготовления DARPin (вся информация которой включена в настоящее описание посредством ссылки), а также C. Zahnd et al. (2010) Cancer Res., 70:1595-1605; Zahnd et al. (2006) J. Biol. Chem., 281(46):35167-35175 и Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23:1257-1268 (все включены в настоящее описание посредством ссылки). Также см. публикации патентных заявок США № 2007/0238667; патент США № 7101675; WO2007/147213 и WO2007/062466 (вся информация которой включена в настоящее описание посредством ссылки) касательно родственного анкиринподобного повторяющегося белка или синтетического пептида.

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

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

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

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

В одном из вариантов реализации связывающийся с клетками агент является антителом против рецептора фолиевой кислоты. Более конкретно, антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который специфически связывает человеческий рецептор фолата 1 (известный также как фолатный рецептор альфа (FR-α)). Термины "человеческий рецептор фолата 1", "FOLR1" или "фолатный рецептор альфа (FR-α)" здесь и далее относится к любому нативному человеческому FOLR1, если не указано иное. Таким образом, все эти термины могут относиться либо к белку либо к последовательности нуклеиновой кислоты, как указано в данном описании. Термин "FOLR1" охватывает "полноразмерный", необработанный FOLR1, а также любую форму FOLR1, которая является результатом обработки внутри клетки. Антитело против FOLR1 содержит (а) CDR1 тяжелой цепи, включающий GYFMN (SEQ ID NO:1); CDR2 тяжелой цепи, включающий RIHPYDGDTFYNQXaa_1F$Xaa_2$$Xaa_3$ (SEQ ID NO:2); и CDR3 тяжелой цепи, включающий YDGSRAMDY (SEQ ID NO:3); и б) CDR1 легкой цепи, включающий KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:4); CDR2 легкой цепи, включающий RASNLEA (SEQ ID NO:5); и CDR3 легкой цепи, включающий QQSREYPYT (SEQ ID NO:6); при этом Xaa_1 выбран из K, Q, H, и R; Xaa_2 выбран из Q, H, N и R и Xaa_3 выбран из G, E, T, S, A и V. Предпочтительно последовательность CDR2 тяжелой цепи содержит RI-

HPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и включающие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFT**GYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQ**
KFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

В другом варианте реализации изобретения антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый ДНК плазмиды, депонированной в ATCC 7 апреля 2010 г. и имеющей депозитные номера ATCC PTA-10772 и PTA-10773 или 10774.

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

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GV
PDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); или
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GV
PDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

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

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

В другом варианте реализации антитело против рецептора фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с рецептором фолиевой кислоты 1 человека, и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, который по меньшей мере около на 90, 95, 99 или 100% идентичен

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQ
KFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11),

и вариабельный домен легкой цепи, который по меньшей мере около на 90, 95, 99 или 100% идентичен

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:12)

или

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGV
PDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:13).

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

В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент является антителом против EGFR или фрагментом такого антитела. В одном варианте осуществления антитело против EGFR является неантагонистическим антителом, включая, например, описанные в WO2012058592 антитела, включенные в настоящее описание посредством ссылки. В другом варианте реализации антитело против EGFR являет-

ся нефункциональным антителом, например гуманизированным ML66 или EGFR-8. Более конкретно, антитело против EGFR является huML66.

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

Антитело	Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой/легкой цепи
huML66HC	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGLSL**ASNSVS**WIRQPPGKGLEWMG**VIWNHG** **GTDYNPSIKS**RLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVR**KGGIYFDY**WGQGV LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG (SEQ ID NO:14)
huML66LC	DTVLTQSPSLAVSPGERATISC**RASESVSTLMH**WYQQKPGQQPKLLIY**LASHRES**G VPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYC**QQSRNDPWT**FGQGTKLELKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

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

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

В другом варианте реализации изобретения антитела против EGFR представляют собой антитела, описанные в 8790649 и WO2012/058588, которые включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации антитело против EGFR является антителом huEGFR-7R.

В одном из вариантов реализации антитело против EGFR включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTF**TSYWMQ**WVKQRPGQGLECIG**TIYPGDGDTT**YTQ
KFQGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCAR**YDAPGYAMDY**WGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:16),

и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINNYLA**WYQHKPGKGPKLLIH**YTSTLHP**GIPSRF
SGSGSGRDYSFSISSLEPEDIATYYC**LQYDNLLYT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17),

или область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDINNYLA**WYQHKPGKGPKLLIH**YTSTLHP**GIPSRF
SGSGSGRDYSFSISSLEPEDIATYYC**LQYDNLLYT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18).

В другом из вариантов реализации антитело против EGFR включает область тяжелой цепи имму-

ноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:16, и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность изложенную в SEQ ID NO:17.

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

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

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

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

QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFT**SNWMH**WVKQAPGQGLEWIG**EIDPSDSYTN**YNQ
NFQGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCAR**GSNPYYYAMDY**WGQGTSVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19),

и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPAIMSASPGERVTMTC**SASSGVNYMH**WYQQKPGTSPRRWIY**DTSKLAS**GVPARFS
GSGSGTDYSLTISSMEPEDAATYYC**HQRGSYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20).

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

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

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

В еще одном варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитела против Muc1, такие как те, которые описаны в патенте США № 7834155, WO2005/009369 и WO2007/024222, включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации антитело против Muc1 включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGQGLEWIG**YIYPGNGATNYNQ**
KFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR**GDSVPFAY**WGQGTLVTVSAASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21),

и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVTITC**SAHSSVSFMH**WFQQKPGTSPKLWIY**STSSLAS**GVPARFG

GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQRSSFPLT**FGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22).

В другом варианте реализации антитело против Muc1 представляет собой антитело huDS6.

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

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

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

В одном из вариантов реализации антитело против CD33 включает область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQ**

KFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSSASTKGP

SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP

KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH

NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:23),

и область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYL**AWYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**

GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL

SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24).

В еще одном варианте реализации антитело против CD33 содержит CDR1-CDR3 тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:23 и/или CDR1-CDR3 легкой цепи согласно SEQ ID NO:24 и предпочтительно специфически связывается с CD33.

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

В другом варианте реализации связывающийся с клетками агент представляет собой антитело против CD37 или его фрагмент, такие как те, которые описаны в патенте США № 8765917 и WO2011/112978, которые включены посредством ссылки. В одном из вариантов реализации изобретения антитело против CD37 представляет собой антитело huCD37-3.

В одном из вариантов реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITC**RASENIRSNLA**WYQQKPGKSPKLLVN**VATNLAD**GVPSRF

SGSGSGTDYSLKINSLQPEDFGTYYC**QHYWGTTWT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY

EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25),

и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLT**TSGVS**WVRQPPGKGLEWLG**VIWGDGSTN**YHPS

LKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAK**GGYSLAH**WGQGTLVTVSSASTKGPSVF

PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV

PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26),

или область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLT**TSGVS**WVRQPPGKGLEWLG**VIWGDGSTN**YHSS

LKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAK**GGYSLAH**WGQGTLVTVSSASTKGPSVF

PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV

PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:27).

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

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

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

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

В еще одном варианте реализации антитело против CD37 включает область легкой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

EIVLTQSPATMSASPGERVTMTC**SATSSVTYMH**WYQQKPGQSPKRWIY**DTSNLPY**GVPARFS

GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSDNPPT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28),

и область тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность

QVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVSGYSIT**SGFAWH**WIRQHPGNKLEWMG**YILYSGSTV**YSP

SLKSRISITRDTSKNHFFLQLNSVTAADTATYYCAR**GYYGYGAWFAY**WGQGTLVTVSAASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:29).

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

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

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

Конъюгаты "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство".

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

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

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

В некоторых вариантах реализации для структурных формул (I')-(VI') один из L', L" и L'" представлен формулой (A')

$$-Z_1\text{-}P\text{-}Z_2\text{-}R_x\text{-}J' \qquad (A'),$$

а другие представляют собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, галоген, -OH, (C_1-C_6)алкокси или $-NO_2$. Более конкретно, один из L', L" и L'" представлен формулой (A'), а другие представляют собой -H.

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

Во втором конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') R_x представляет собой линейный, разветвленный или циклический алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой, гало(C_1-C_3)алкилом, заряженным заместителем или ионизируемой группой Q; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или для первого конкретного варианта реализации.

В некоторых вариантах реализации Q представляет собой I) $-SO_3H$, -Z'-SO_3H, $-OPO_3H_2$, -Z'-OPO_3H_2, $-PO_3H_2$, -Z'-PO_3H_2, $-CO_2H$, -Z'-CO_2H, $-NR_{11}R_{12}$ или -Z'-$NR_{11}R_{12}$, или их фармацевтически приемлемую соль; либо II) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ или -Z-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14}-R_{16}, каждый независимо, представляют собой необязательно замещенный алкил и X^- представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для второго конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой $-SO_3H$ или его фармацевтически приемлемую соль.

В третьем конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') J содержит фрагмент, ковалентно связанный с СКА и являющийся $-NR^{c1}$ или -C(=O)-, где R^{c1} представляет собой -H, линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 4 атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH или (C_1-C_3)алкокси; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации, первого конкретного варианта реализации или второго конкретного варианта реализации.

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

В четвертом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') L' описан следующей формулой:

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J' \qquad (B1');$$

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J' \qquad (B2');$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J' \qquad (C1'); \text{ или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J' \qquad (C2'),$$

где J' представляет собой -C(=O)-;

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

m равен целому числу от 1 до 6;

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

Cy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом; а другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго или третьего конкретных вариантов реализации.

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

В пятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') L' представлен следующей формулой:

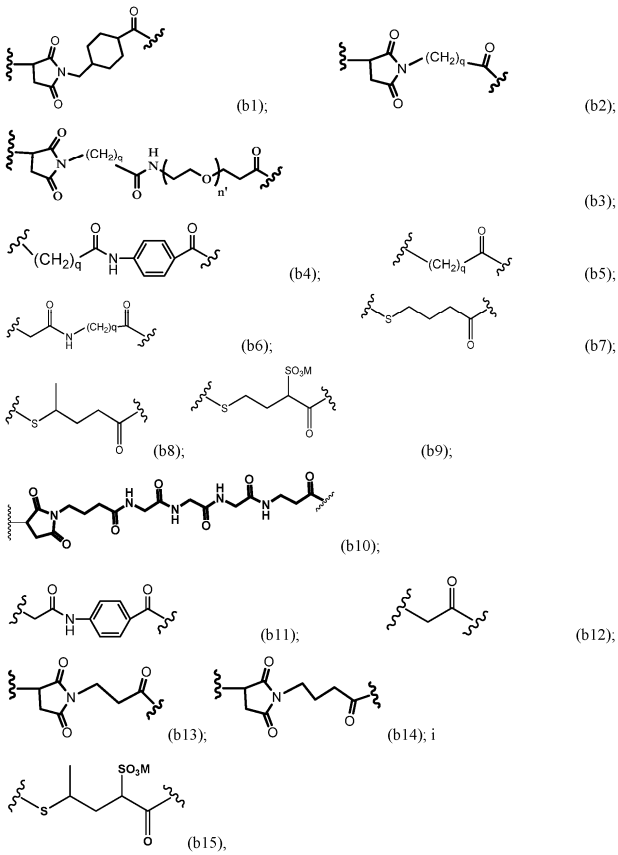
$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^{s1} \qquad (B3'); \text{ или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^{s1} \qquad (C3'),$$

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

m равен целому числу от 1 до 6;

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



где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой -H или SO_3M;

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

В некоторых вариантах реализации заряженный заместитель или ионизируемая группа Q представляет собой I) $-SO_3H$, -Z'-SO_3H, $-OPO_3H_2$, -Z'-OPO_3H_2, $-PO_3H_2$, -Z'-PO_3H_2, $-CO_2H$, -Z'-CO_2H, $-NR_{11}R_{12}$, или -Z'-$NR_{11}R_{12}$, или их фармацевтически приемлемую соль либо II) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ или -Z'-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный циклоалкилен или необязательно замещенный фенилен; R_{14}-R_{16}, каждый независимо, представляют собой необязательно замещенный алкил и X^- представляет собой фармацевтически приемлемый анион; а другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Q представляет собой $-SO_3H$ или его фармацевтически приемлемую соль.

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

В некоторых вариантах реализации $-(CR_aR_b)_m-$ представляет собой $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ и m'' равен целому числу от 1 до 5; другие переменные такие же, как описано выше для пятого конкретного варианта реализации.

В шестом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 10 аминокислотных остатков; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого или пятого конкретных вариантов реализации.

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

В некоторых вариантах реализации P выбран из

Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala;

другие переменные такие же, как описано выше для шестого конкретного варианта реализации.

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

В седьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') двойная линия ⚌ между N и C представляет двойную связь; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого или шестого конкретных вариантов реализации.

В восьмом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') двойная линия ⚌ между N и C представляет двойную связь, X представляет собой -H или аминозащитную группу и Y выбран из -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", необязательно замещенного 5-6-членного азотсодержащего гетероцикла, $-SO_3H$, $-SO_2H$ и OSO_3H; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого или седьмого конкретных вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации Y выбран из -H, $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt или -NHOH, где M представляет собой -H, Na^+ или K^+; другие переменные такие же, как описано выше для седьмого конкретного варианта реализации. Более конкретно, Y представляет собой -H, $-SO_3M$ или -OH.

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

В некоторых вариантах реализации X' представляет собой -H, -OH, (C_1-C_3)алкил, гало(C_1-C_3)алкил или фенил; другие переменные такие же, как описано выше для девятого конкретного варианта реализации. Более конкретно, X' представляет собой -H, -OH или -Me. Еще более конкретно X' представляет собой -H.

В десятом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') Y' представляет собой -H, оксогруппу, (C_1-C_3)алкил или гало(C_1-C_3)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого или девятого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, Y' представляет собой -H или оксогруппу. Еще более конкретно Y' представляет собой H.

В одиннадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') A и A' являются одинаковыми или разными и выбраны из -O-, -S-, $-NR_5-$ и оксогруппы (C=O)-; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, A и A' являются одинаковыми или разными и выбраны из -O- или -S-. Еще более конкретно A и A' представляют собой -O-.

В двенадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') R_6 представляет собой -OMe; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого или одиннадцатого конкретных вариантов реализации.

В тринадцатом конкретном варианте осуществления для структурных формул (I')-(VI') R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' представляют собой независимо -H, галоген, $-NO_2$, -OH, (C_1-C_3)алкил, гало(C_1-C_3)алкил или (C_1-C_3)алкоксигруппу; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого или двенадцатого конкретных вариантов реализации. Более конкретно, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' все представляют собой -H.

В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') R, R', R" и R_5, каждый независимо, представляют собой -H или (C_1-C_3)алкил; другие переменные такие же, как описано выше для первого варианта реализации или первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого, десятого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого конкретных вариантов реализации.

В четырнадцатом конкретном варианте реализации для структурных формул (I')-(VI') двойная линия ⚌ между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двой-

ная связь, то X отсутствует и Y представляет собой -H, а если это одинарная связь, то X представляет собой -H, Y представляет собой -OH или $-SO_3M$;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' и R_4' все представляют собой -H;

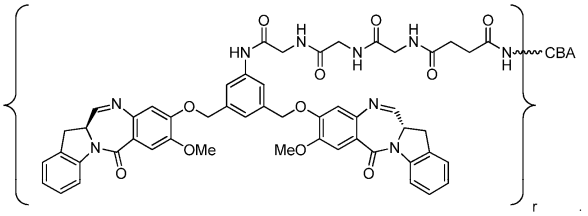
R_6 представляет собой -OMe;

X' и Y', оба, представляют собой -H;

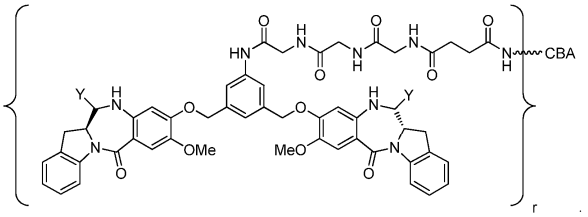
A и A' представляют собой -O-;

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

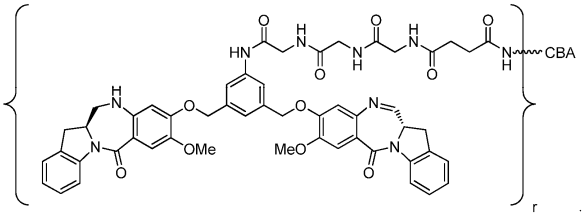
В пятнадцатом конкретном варианте реализации конъюгат согласно настоящему изобретению представлен любой из нижеследующих структурных формул:



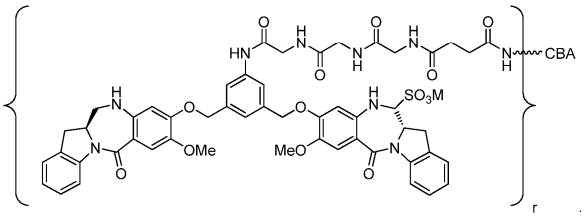
r ;



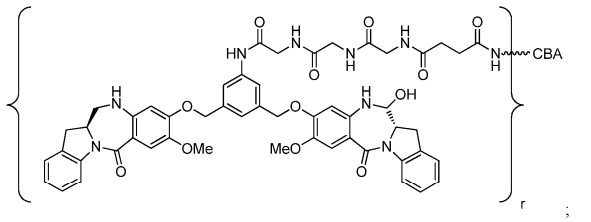
r ;



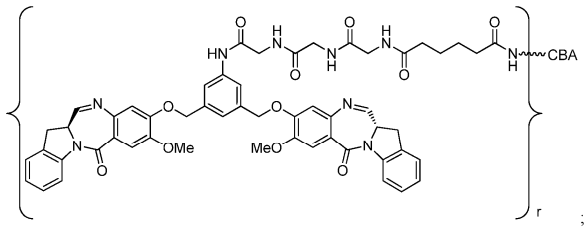
r ;



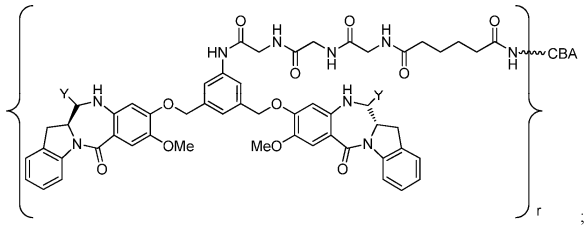
r ;



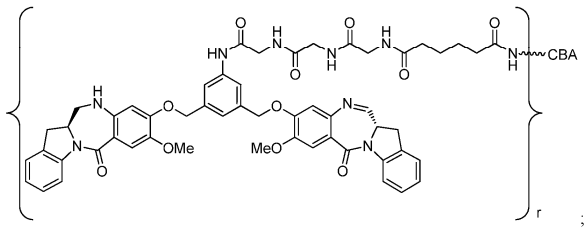
r ;



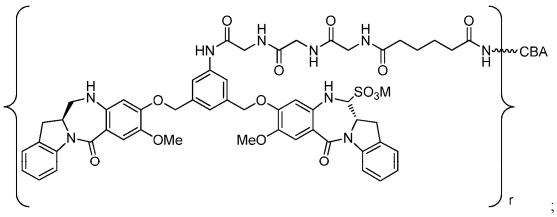
r ;



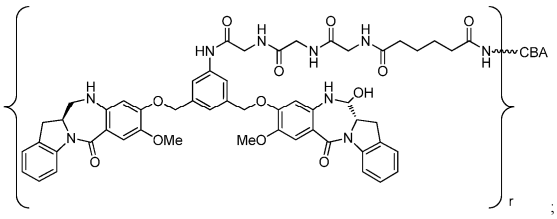
r ;



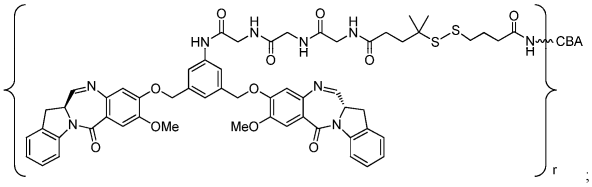
r ;



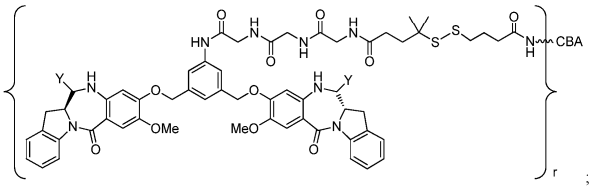
r ;



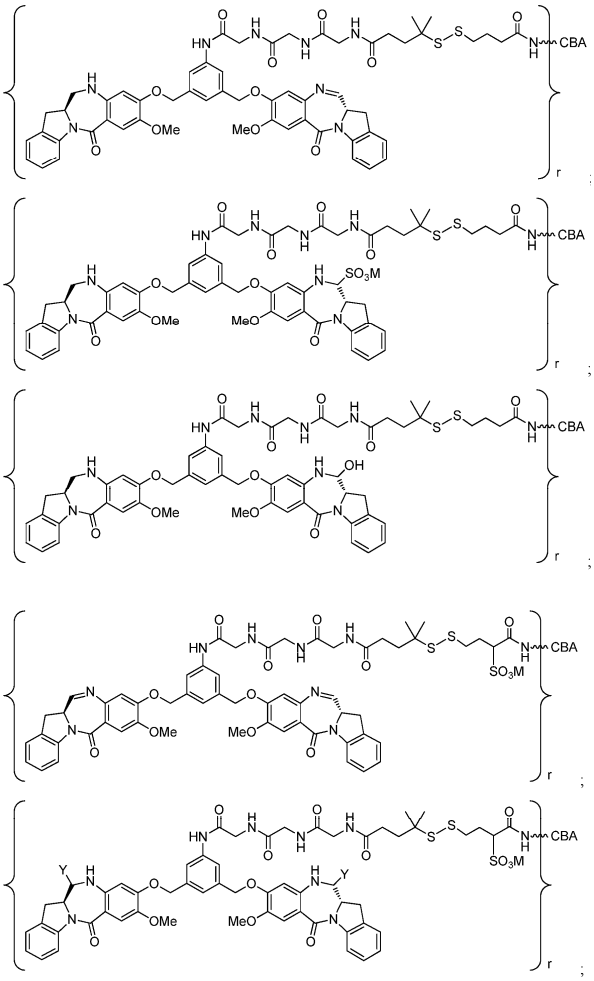
r ;

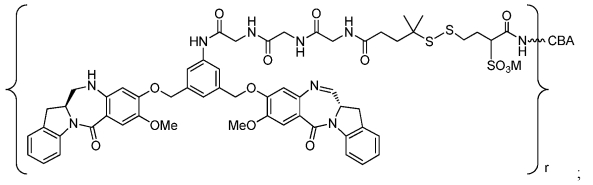


r ;

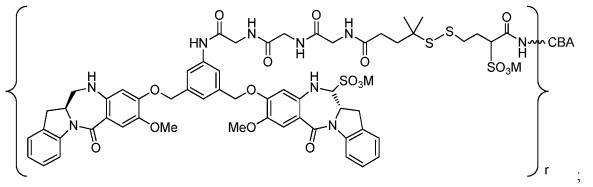


r ;

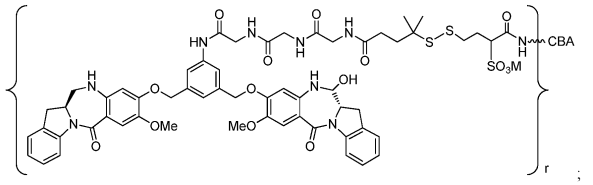




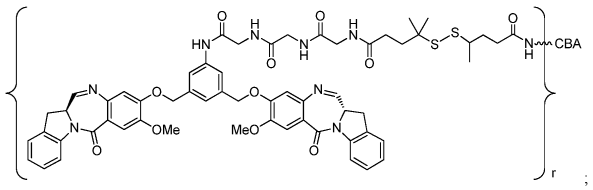
;



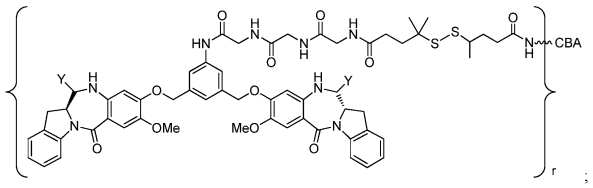
;



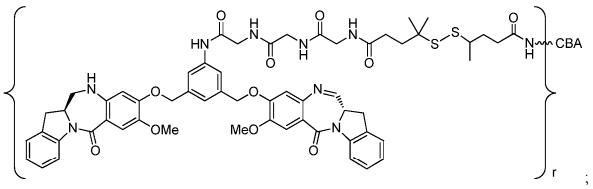
;



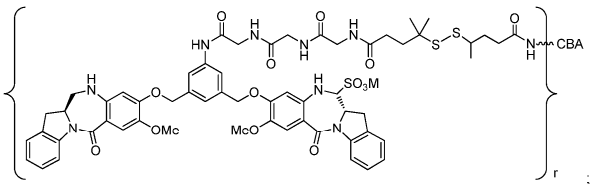
;



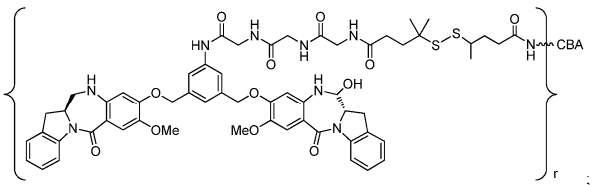
;



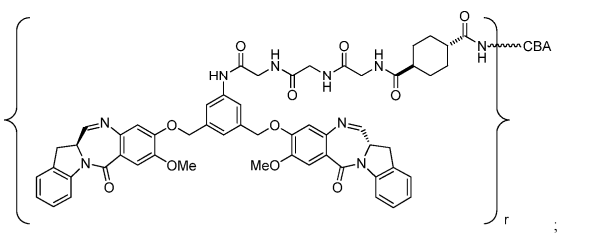
;



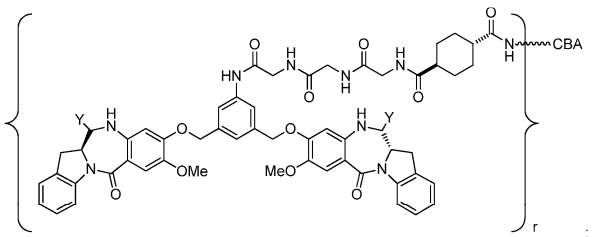
;

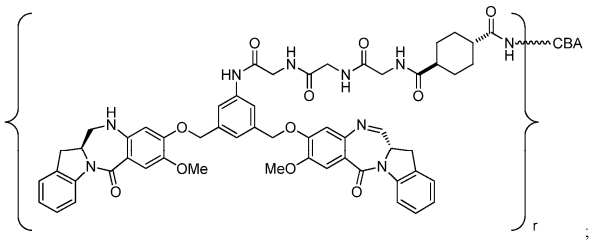


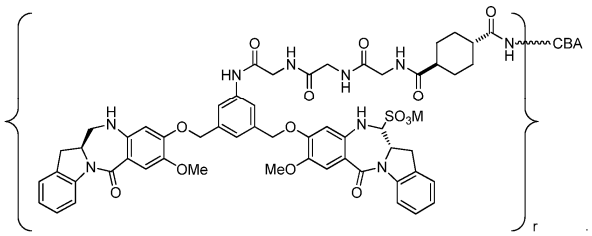
;

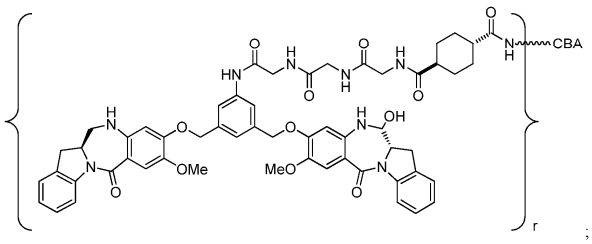


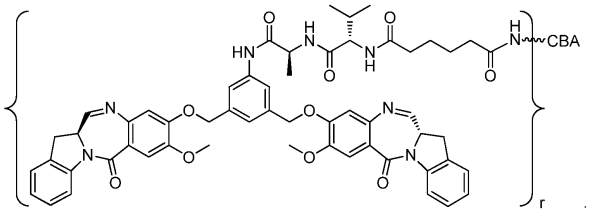
;

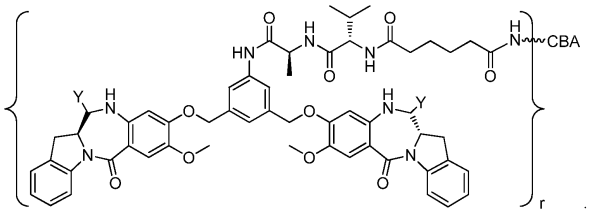

CBA
HN
Y
OMe
MeO
r

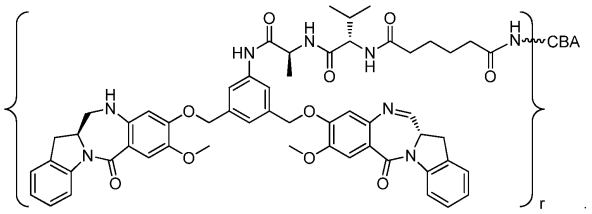

CBA
HN
OMe
MeO
r

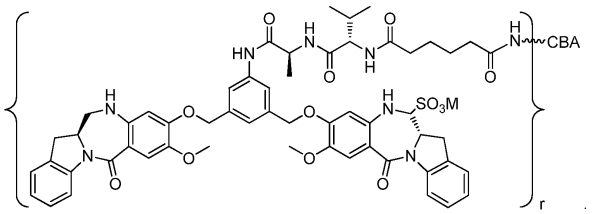

CBA
HN
SO3M
OMe
MeO
r

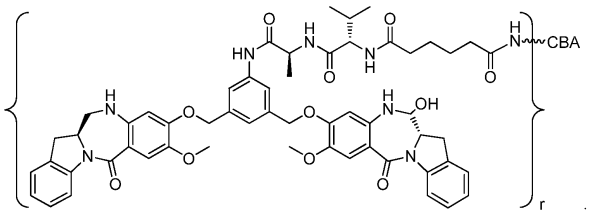

CBA
HN
OH
OMe
MeO
r

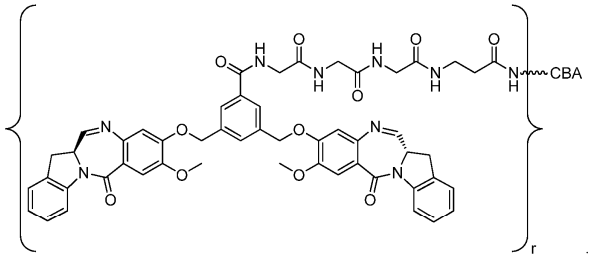

CBA
r
;


Y
CBA
r
;

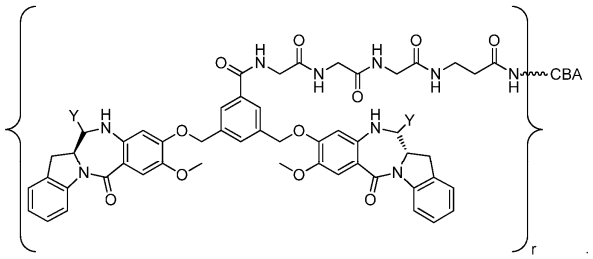

CBA
r
;


SO3M
CBA
r
;

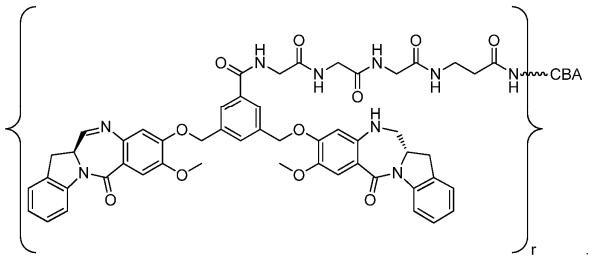

OH
CBA
r
;


CBA
r

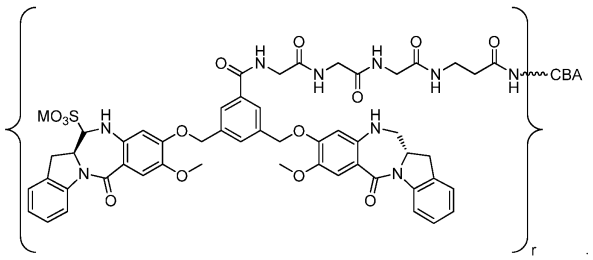
;


Y
CBA
r

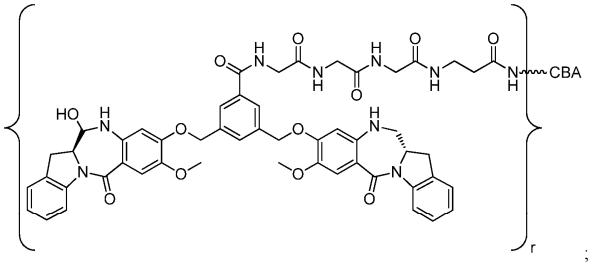
;


CBA
r

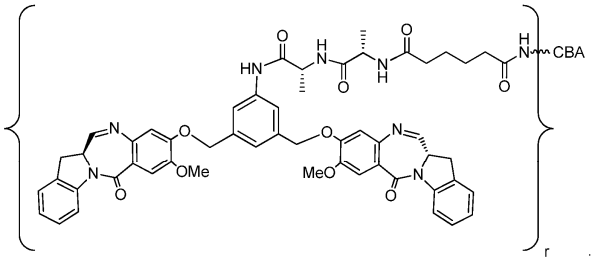
;


MO3S
CBA
r

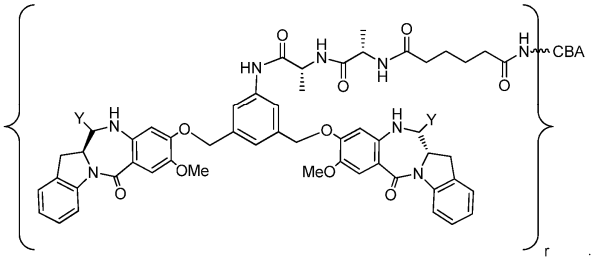
;



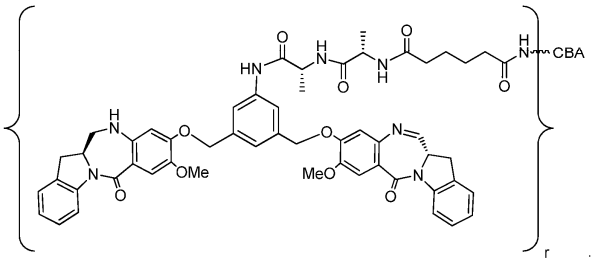
r ;



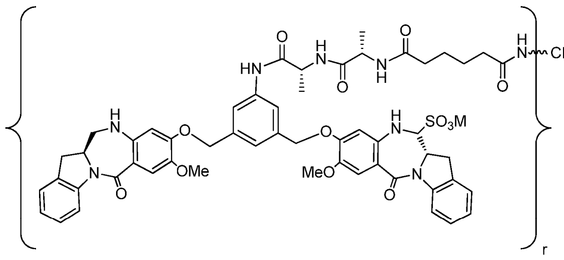
r ;



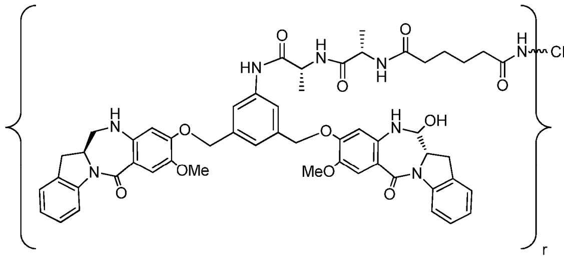
r ;



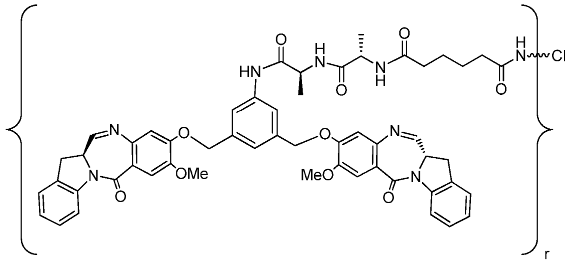
r ;



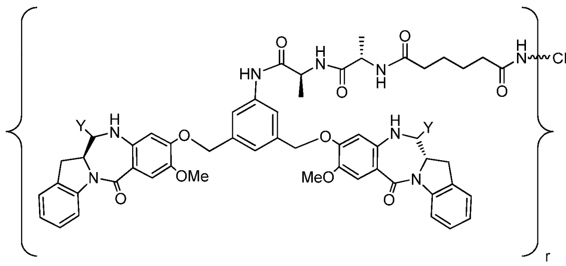
;



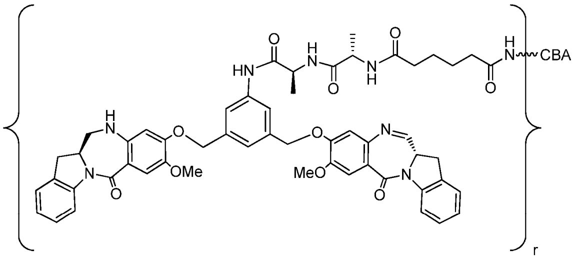
;



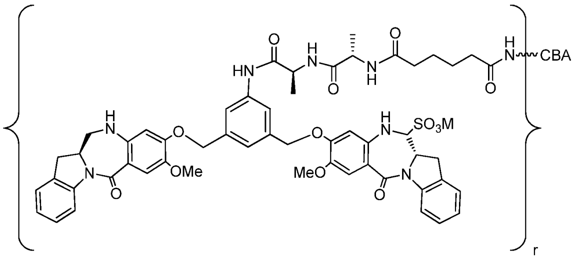
;



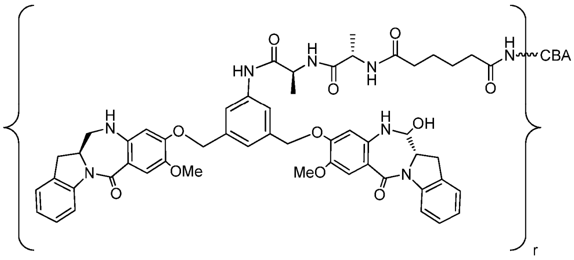
;



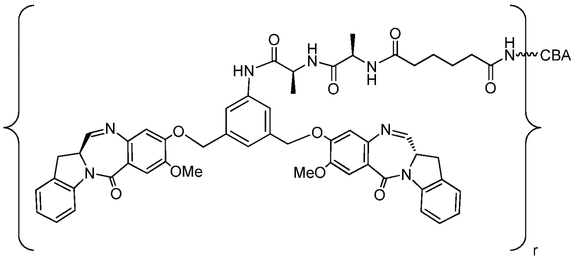
;



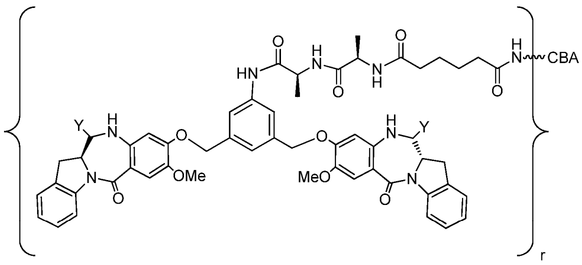
;



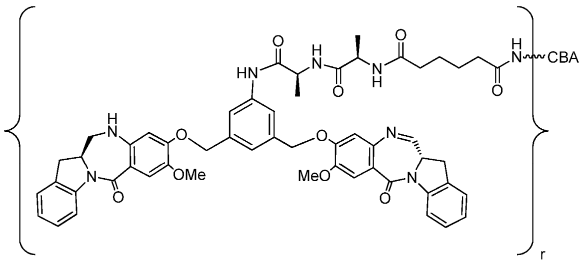
;



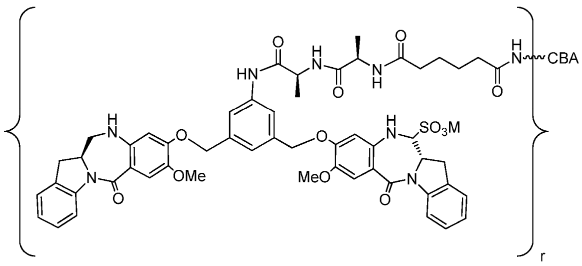
;



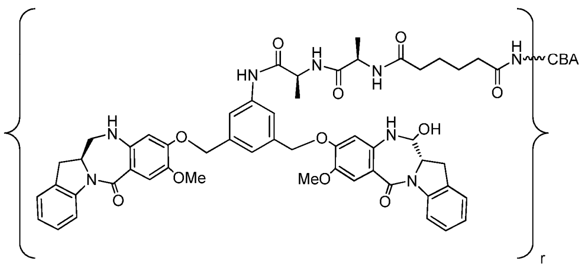
;



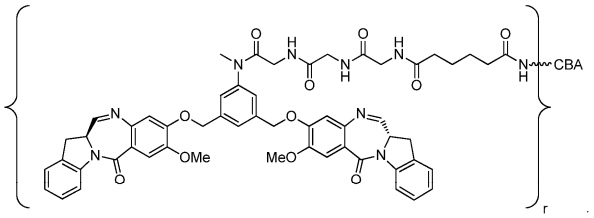
;

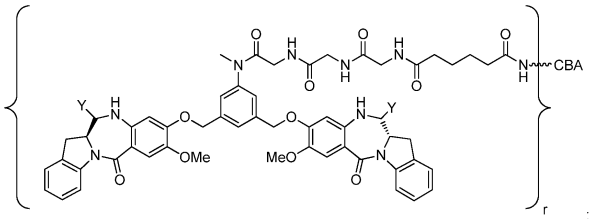


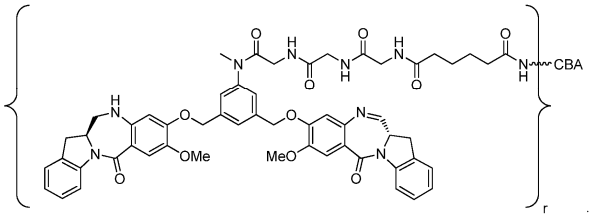
;

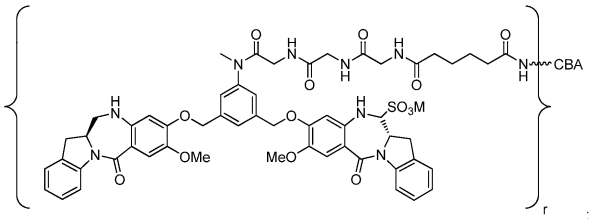


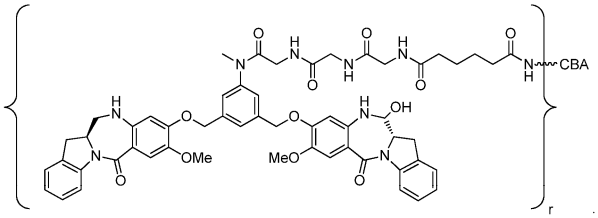
;

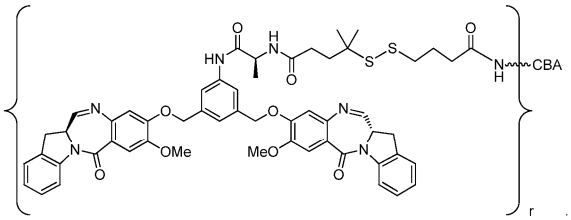


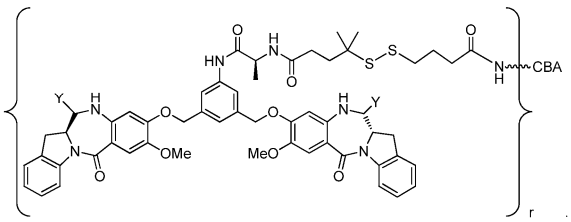


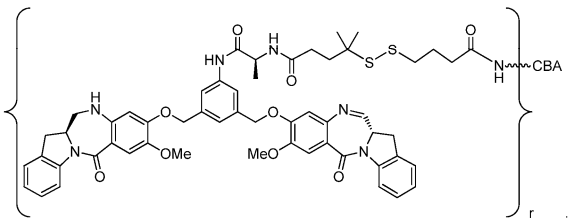


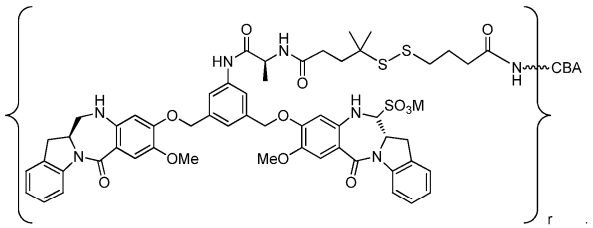




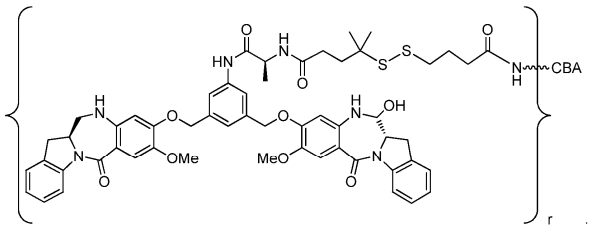




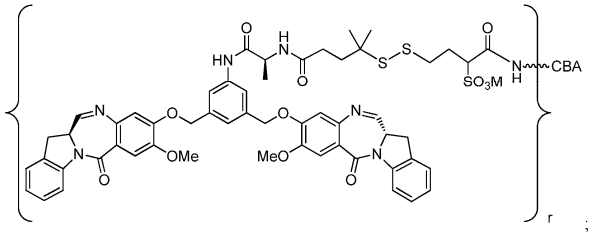




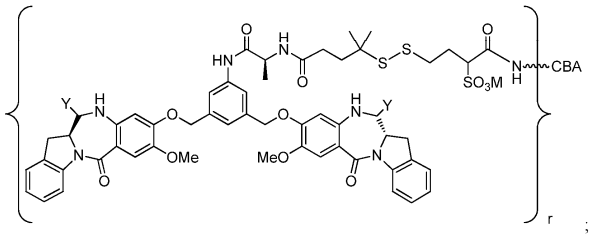
;



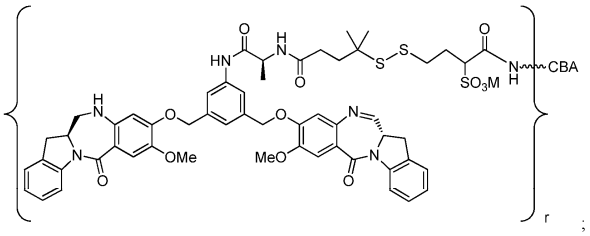
;



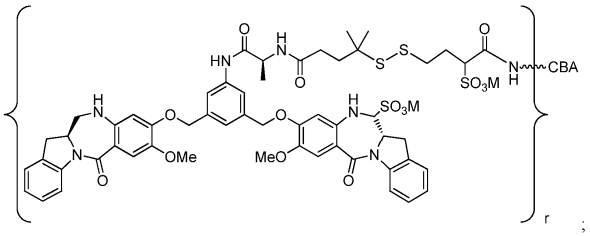
;



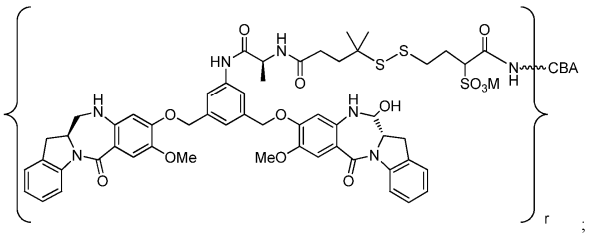
;



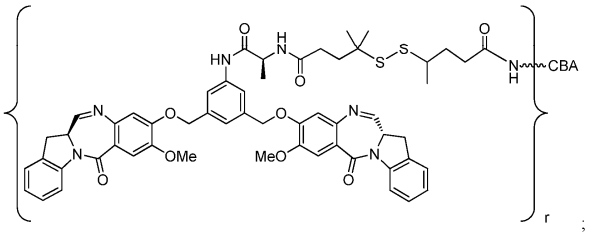
;



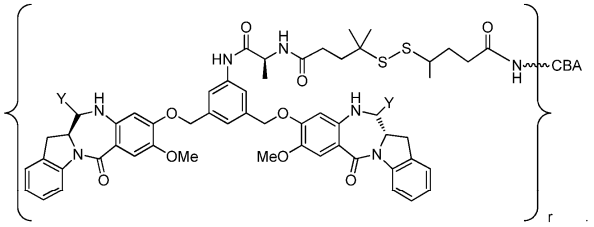
;



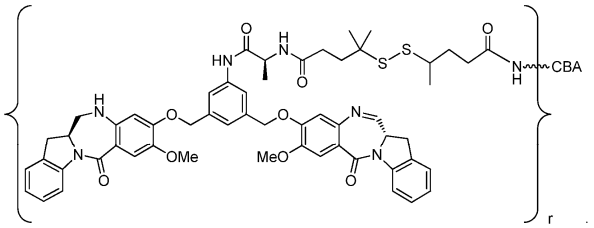
;



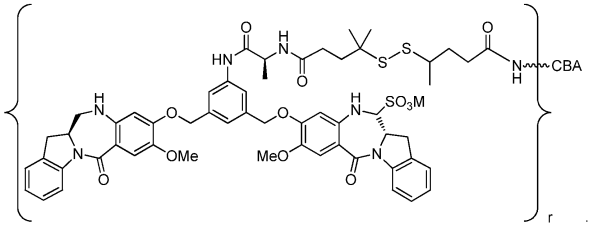
;



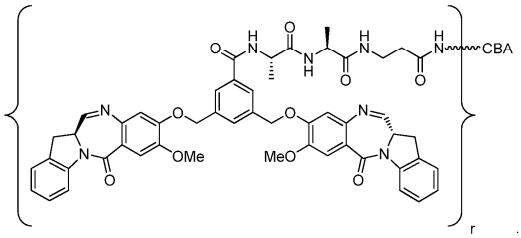
;



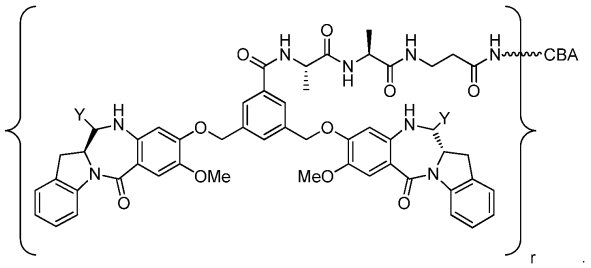
;



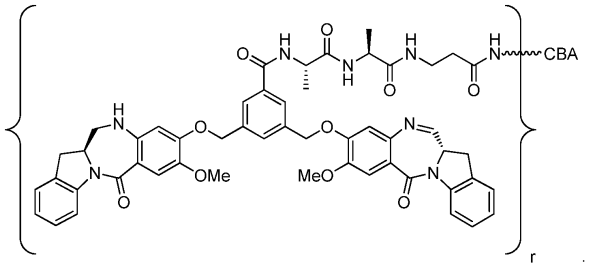
;



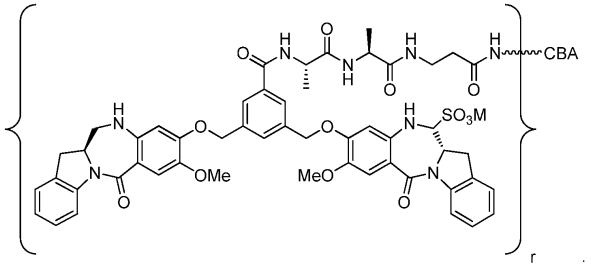
;



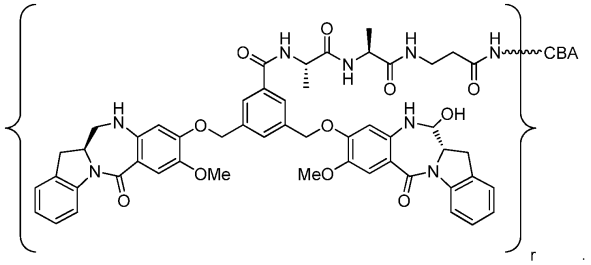
r ;



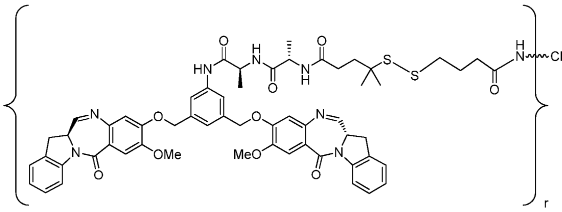
r ;

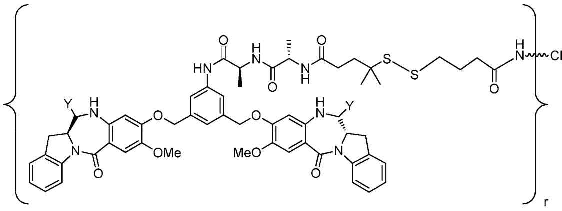


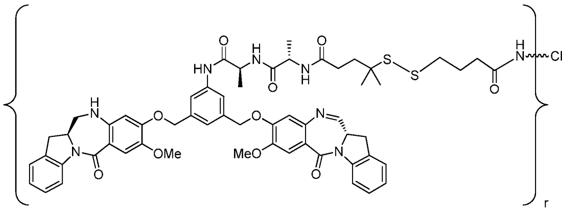
r ;

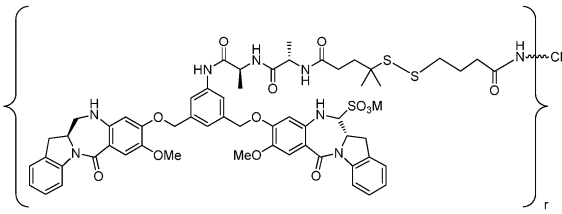


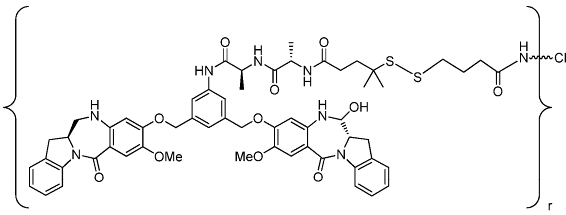
r ;

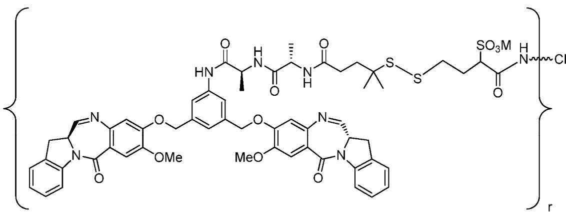

;

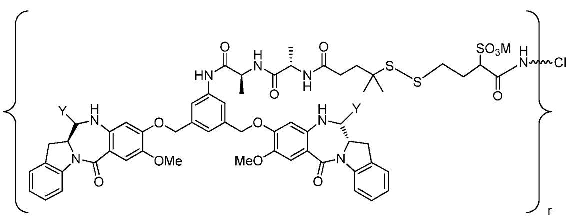

;

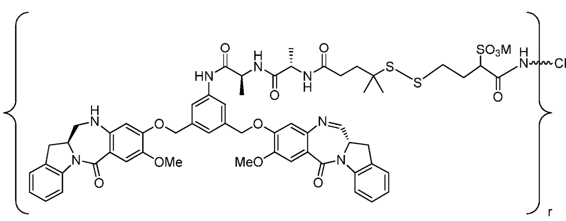

;

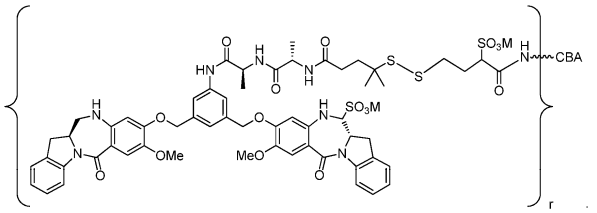

;


;

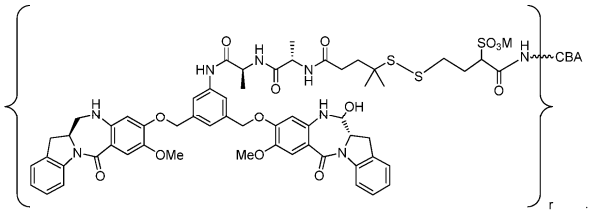

;


;

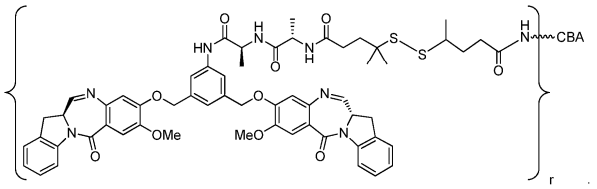

;



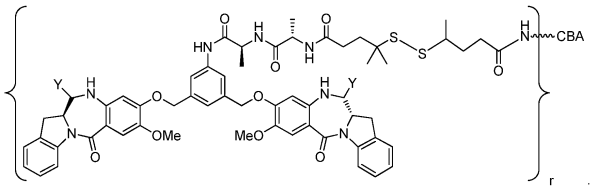
r ;



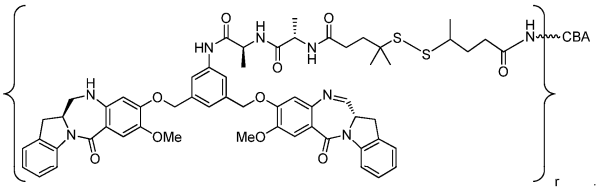
r ;



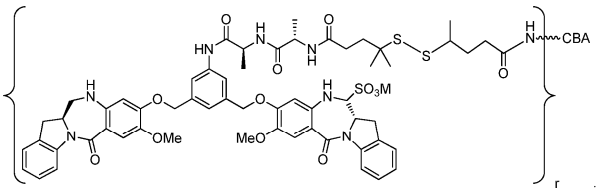
r ;



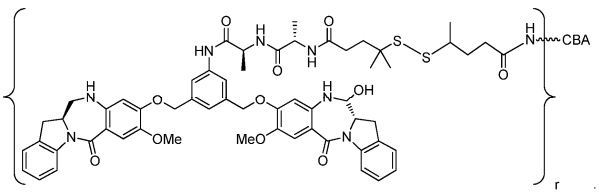
r ;



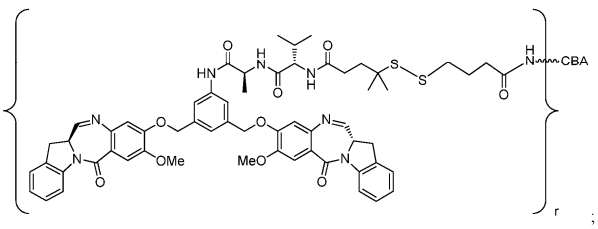
r ;



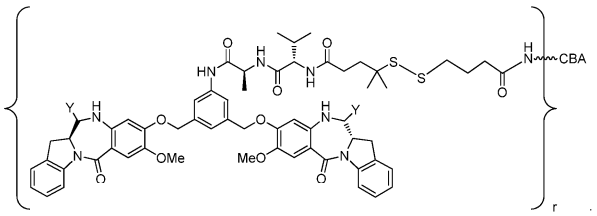
r ;



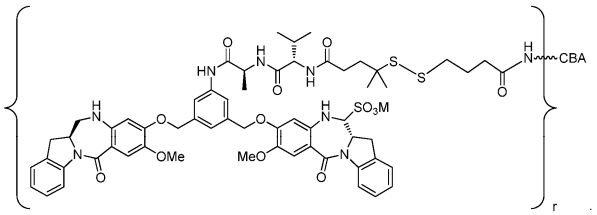
r ;



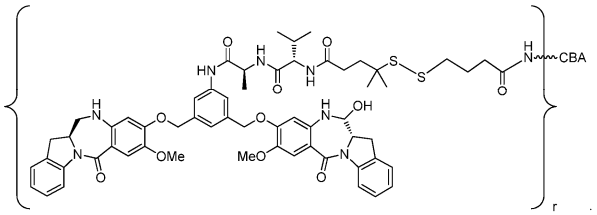
r ;



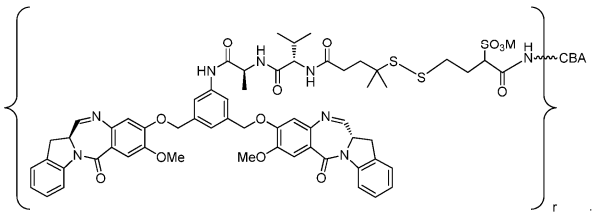
r ;



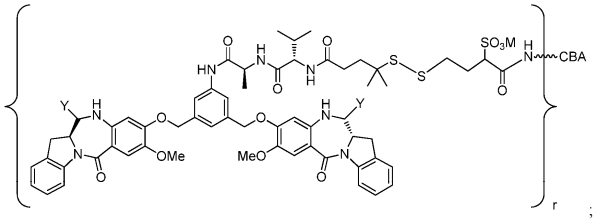
r ;



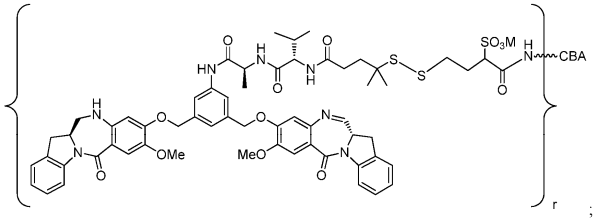
r ;



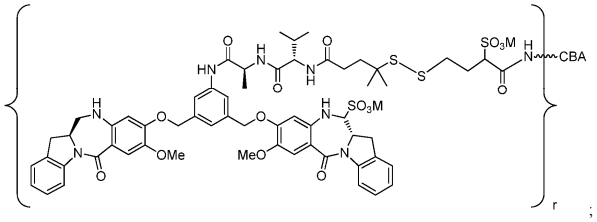
r ;



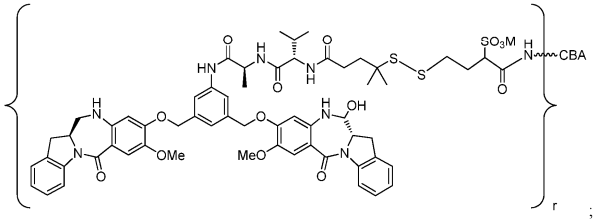
r ;



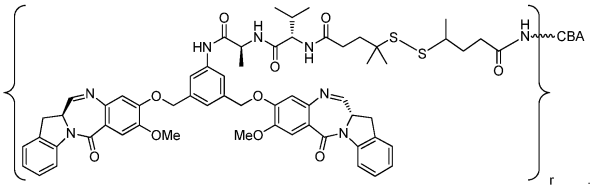
r ;



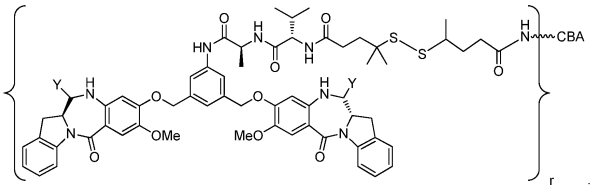
r ;



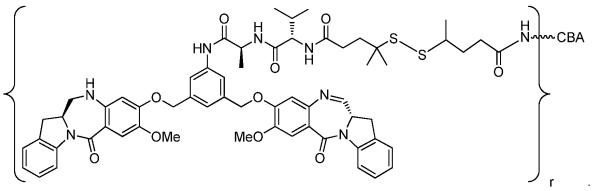
r ;



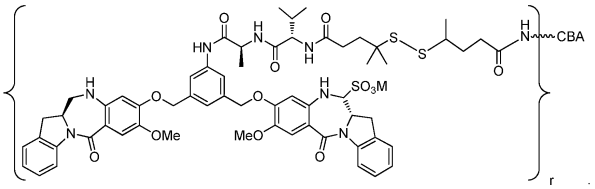
;



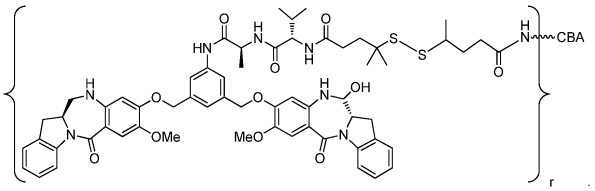
;



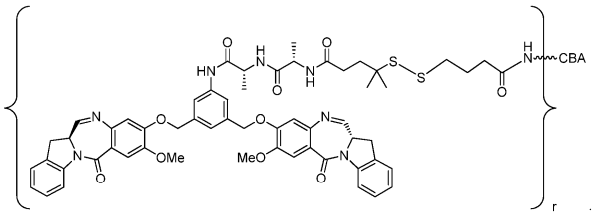
;

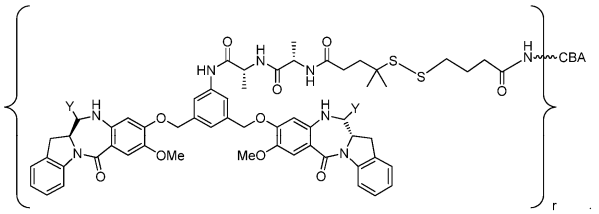


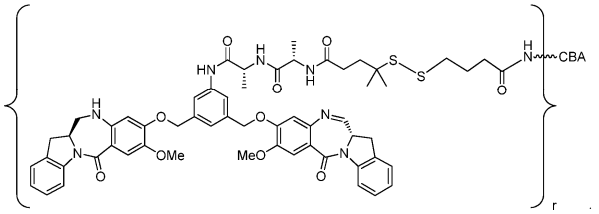
;

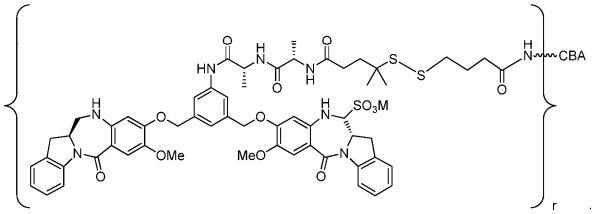


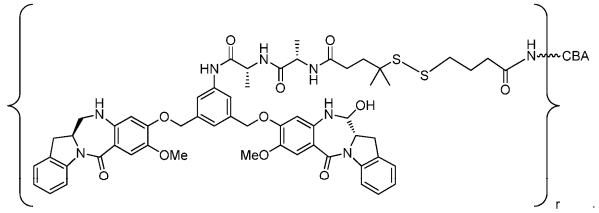
;

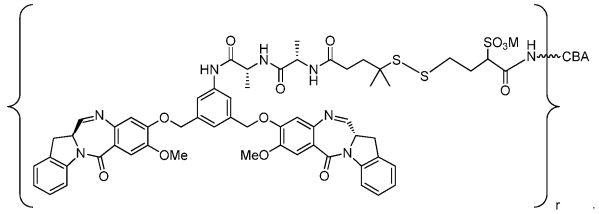


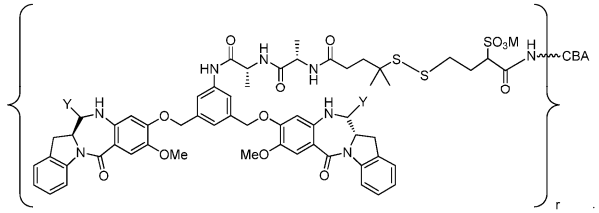


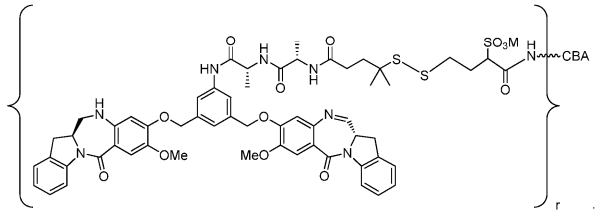


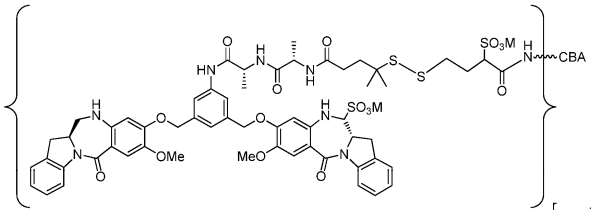




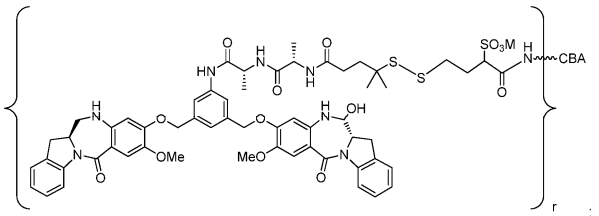




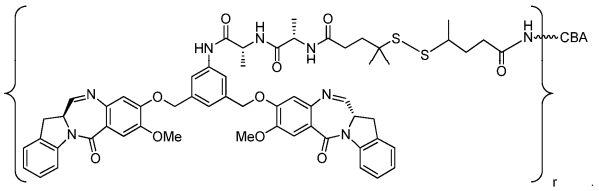




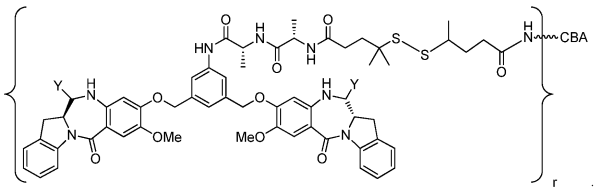
r ;



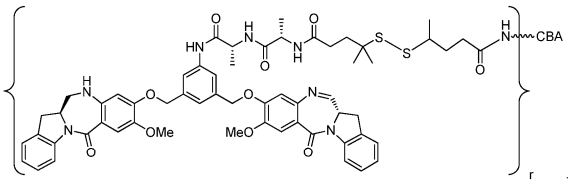
r ;



r ;

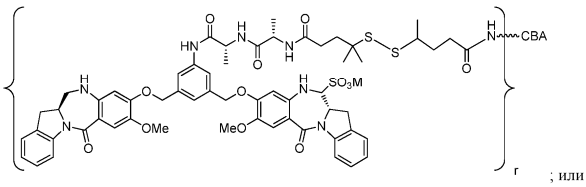


r ;

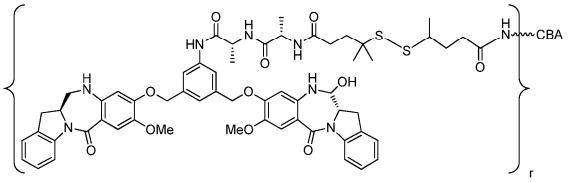


r ;

или



r ; или



r ,

или его фармацевтически приемлемой соли,

где r равен целому числу от 1 до 10;

Y представляет собой -H, -OH или $-SO_3M$ и

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

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

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

В любом из вариантов реализации конъюгатов, например, согласно второму варианту реализации или с 1-го по 15-й конкретных вариантов реализации связывающийся с клетками агент может связываться с целевыми клетками, выбранными из опухолевых клеток, зараженных вирусом клеток, зараженных

микроорганизмом клеток, зараженных паразитом клеток, аутоиммунных клеток, активированных клеток, миелоидных клеток, активированных Т-клеток, В-клеток или меланоцитов; клеток, экспрессирующих антигены CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA или Her-2; антигенов Her-3; или клеток, экспрессирующих рецептор инсулинового фактора роста, рецептор эпидермального фактора роста и фолатный рецептор.

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

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

Антитело может являться моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом такого моноклонального антитела.

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах реализации изобретения способ предназначен для лечения состояния, выбранного из группы, включающей рак, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, реакцию "трансплантат-против-хозяина" (РТПХ), отторжение трансплантата, волчанку, миозит, инфекцию и иммунодефицит.

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

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

Изготовление конъюгатов "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство".

Чтобы присоединить цитотоксические соединения или их производное согласно настоящему изобретению к связывающемуся с клетками агенту, цитотоксическое соединение может включать соединительный фрагмент с присоединенной к нему реакционноспособной группой, например соединение 14

(пример 1), 23 (пример 2), 35 (пример 3), 49 (пример 4), 80 (пример 5), 90 (пример 6), 63 (пример 7) или 70 (пример 8). Эти соединения могут быть непосредственно связаны со связывающимся с клетками агентом. Характерные процессы присоединения цитотоксических соединений, имеющих реакционноспособную группу, со связывающимся с клетками агентом с получением конъюгатов "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство" описаны в примерах 11, 13, 14-17, 19 и 20.

В одном варианте реализации изобретения бифункциональный сшивающий реагент может сначала прореагировать с цитотоксическим соединением с получением соединения, несущего линкерный фрагмент, с одной присоединенной к нему реакционноспособной группой (то есть соединение лекарство-линкер), которое может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом. Альтернативно, один конец бифункционального сшивающего реагента может сначала прореагировать со связывающимся с клетками агентом с получением вещества, несущего линкерный фрагмент с одной реакционноспособной группой, которая может затем реагировать с цитотоксическим соединением. Линкерный фрагмент может содержать химическую связь, позволяющую высвобождение цитотоксического фрагмента в определенном месте. Подходящие химические связи хорошо известны в данной области техники и включают дисульфидные связи, тиоэфирные связи, кислотно-лабильные связи, фотолабильные связи, пептидазо-лабильные связи и эстеразо-лабильные связи (см., например, патенты США 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 и 7414073). Предпочтительны дисульфидные связи, тиоэфирные и пептидазо-лабильные связи. Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают нерасщепляемые линкеры, такие как описанные в публикации патентной заявки США № 2005/0169933, или же заряженные или гидрофильные линкеры, описанные в документах US 2009/0274713, US 2010/01293140 и WO2009/134976, каждая из которых положительным образом включена в настоящее описание посредством ссылки.

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

В другом варианте реализации изобретения тиолсодержащее цитотоксическое соединение, описанное в данном описании, такое как соединение 98 или 99, может вступать в реакцию с бифункциональным сшивающим агентом, таким как N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) 2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), с образованием соединения цитотоксический агент-линкер, которое может затем реагировать со связывающимся с клетками агентом с получением дисульфидно связанного конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство" согласно настоящему изобретению. Соединение цитотоксический агент-линкер может быть получено in situ без очистки перед реакцией со связывающимся с клетками агентом. Пример процесса описан в примерах 12 и 18. Альтернативно, соединение цитотоксический агент-линкер может быть очищено перед реакцией со связывающимся с клетками агентом.

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

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

В другом варианте реализации изобретения раствор связывающегося с клетками агента (например, антитела) в водном буфере можно инкубировать с молярным избытком модифицирующего антитела агента, такого как N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (СМЦК) для вве-

дения малеимидных групп, или N-сукцинимидил-4-(иодацетил)аминобензоат (СИАБ) для введения иодацетильных групп. Модифицированное связывающийся с клетками агент (например, модифицированное антитело) затем подвергают взаимодействию с тиолсодержащим цитотоксическим соединением, с получением тиоэфирно связанного конъюгата "связывающийся с клетками агент - цитотоксическое средство". Конъюгат может быть затем очищен с помощью методов, описанных выше.

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

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

Цитотоксичность соединений и конъюгатов.

Цитотоксические соединения и конъюгаты "связывающийся с клетками агент - лекарственное средство" согласно изобретению могут быть оценены по их способности подавлять пролиферацию различных линий раковых клеток in vitro. Например, для оценки цитотоксичности этих соединений и их конъюгатов могут быть использованы такие клеточные линии, как линия клеток рака шейки матки человека KB, линия клеток острого моноцитарного лейкоза человека THP-1, линия клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL60, линия клеток острого миелоидного лейкоза человека HNT-34. Оцениваемые клетки могут подвергаться воздействию соединений или конъюгатов в течение 1-5 дней, и выжившие фракции клеток измерены в прямых анализах известными способами. Затем значения IC_{50} можно рассчитать по результатам анализов. Альтернативно или дополнительно, в качестве одного из пособий по определению типов рака, которые могут быть чувствительными к лечению соединениями или конъюгатами согласно изобретению, можно использовать фильтр по in vitro чувствительности клеточных линий, такой как описанный Национальным Институтом Рака США (см. Voskoglou-Nomikos et al., 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239, включена посредством ссылки).

Примеры эффективности in vitro и целевой специфичности конъюгатов антитело-цитотоксический агент согласно настоящему изобретению показаны на фиг. 2 и 4. Все конъюгаты являются чрезвычайно цитотоксическими по отношению к антиген-положительным раковым клеткам, с IC_{50} в низком пикомолярном диапазоне. Антиген-отрицательные линии клеток остаются жизнеспособными при воздействии тех же конъюгатов.

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

Композиции и способы применения.

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

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

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

Аналогичным образом настоящее изобретение относится к способу индукции гибели клеток в выбранных клеточных популяциях, который включает контактирование клетки-мишени или ткани, содержащей клетки-мишени, с эффективным количеством цитотоксического средства, содержащего любое из цитотоксических соединений - связывающихся с клетками агентов (например, индолинобензодиазепинового или оксазолидинобензодиазепинового димера, присоединенного к связывающемуся с клетками

агенту) согласно настоящему изобретению, его соль или его сольват. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми может связываться связывающийся с клетками агент.

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

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

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

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

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

Условия неклинического использования in vitro легко определяются обычным специалистом в данной области техники.

Примерами клинического применения ex vivo являются удаление опухолевых клеток или лимфоидных клетки из костного мозга перед аутологичной трансплантацией при лечении рака или при лечении аутоиммунных заболеваний, или для удаления Т-клеток и других лимфоидных клеток из аутогенного или аллогенного костного мозга или ткани до пересадки в целях предотвращения РТПХ. Лечение может быть проведено следующим образом. Костный мозг отбирают из пациента или другого индивидуума, а затем инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавляется цитотоксический агент согласно изобретению в концентрации в диапазоне от около 10 мкМ до 1 пкМ, в течение от около 30 мин до около 48 ч при температуре около 37°С. Точные условия концентрации и времени инкубации, то есть доза, легко определяются обычным специалистом в данной области техники. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту внутривенно в соответствии с известными способами. В тех случаях, когда пациент между временем забора костного мозга и реинфузии обработанных клеток получает другое лечение, такое как курс аблятивной химиотерапии или облучения всего тела, обработанные клетки костного мозга хранят в замороженном виде в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

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

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

Противораковые медикаменты и их дозировки, пути введения и рекомендуемое применение известны в данной области и описаны в такой литературе, как Настольный справочник врача (НСВ). НСВ описывает дозировки средств, которые были использованы при лечении различных видов рака. Схема применения и дозировки этих вышеуказанных химиотерапевтических лекарственных средств, которые являются терапевтически эффективными, будут зависеть от конкретного рака, подлежащего лечению, тяжести заболевания и других факторов, знакомых врачу-специалисту в данной области, и могут быть определены врачом. Содержимое НСВ специально включено в данное описание в полном объеме по-

средством ссылки. Специалист в данной области может просмотреть НСВ, используя один или несколько из следующих параметров, для определения схемы применения и дозы химиотерапевтических средств и конъюгатов, которые могут быть использованы в соответствии с идеями настоящего изобретения. Эти параметры включают:

подробный указатель,

по производителю,

продукты (по названию компании или торговой марке-наименованию препарата),

указатель по категориям,

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

цветные изображения препаратов,

информация о продукте в соответствии с маркировкой FDA,

химическая информация,

функция/действие,

показания и противопоказания,

клинические исследования, побочные эффекты, предупреждения,

аналоги и производные.

Специалистам в области цитотоксических средств будет легко понять, что каждое из описанных здесь цитотоксических средств может быть модифицировано таким образом, что получаемое в результате соединение по-прежнему сохраняет специфичность и/или активность исходного соединения. Специалисту также ясно, что многие из этих соединений могут быть использованы вместо цитотоксических средств, описанных в данном документе. Таким образом, цитотоксические средства согласно настоящему изобретению включают аналоги и производные соединений, описанных в настоящем документе.

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

Примеры

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

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

Me = метил,

Et = этил,

Pr = пропил,

и-Pr = изопропил,

Bu = бутил,

т-Bu = трет-бутил,

Ph = фенил,

Ac = ацетил,

AcOH или HOAc = уксусная кислота,

ACN или CH_3CN = ацетонитрил,

Ala = аланин,

водн. = водный,

BH_3·ДМС = комплекс боран-диметилсульфид,

Bn = бензил,

Бок или БОК = трет-бутоксикарбонил,

CBr_4 = карбонтетрабромид,

Cbz или Z = бензилоксикарбонил,

ДХМ или CH_2Cl_2 = дихлорметан,

ДХЭ = 1,2-дихлорэтан,

ДМАП = 4-диметиламинопиридин,

ДИ вода = деионизированная вода,

ДИБАЛ = диизобутилалюминия гидрид,

ДИЭА или ДИПЭА = N,N-диизопропилэтиламин,

ДМА = N,N-диметилацетамид,

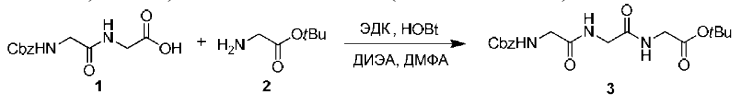
ДМФА = N,N-диметилформамид,

ДМСО = диметилсульфоксид,

ДТТ = дитиотреитол,

ЭДК = 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид,
ЭЭДХ = N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин,
ЭРИ или ЭР = ионизация электрораспылением,
EtOAc= этилацетат,
Gly = глицин,
г = граммы,
ч = час,
ГАТУ = N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафосфат,
ВЭЖХ = высокоэффективная жидкостная хроматография,
ГОБт или ГОБТ = 1-гидроксибензотриазол
АГЛ = алюмогидрид лития,
ЖХ = жидкостная хроматография,
ЖХМС = жидкостная хромато-масс-спектрометрия,
мин = минуты,
мг = миллиграммы,
мл = миллилитры,
ммоль = миллимоли,
мкг = микрограммы,
мкл = микролитры,
мкмоль = микромоли,
Me = метил,
MeOH = метанол,
MeI = метилйодид,
МС = масс-спектрометрия,
MsCl = метансульфонилхлорид (мезилхлорид),
Ms_2O = метансульфоновый ангидрид,
$NaBH(OAc)_3$ = натрия триацетоксиборгидрид,
NHS = N-гидроксисукцинамид,
ЯМР = спектроскопия ядерного магнитного резонанса,
PPh_3 = трифенилфосфин,
ПТСХ = препаративная тонкослойная хроматография,
рац. = рацемическая смесь,
R_f = коэффициент удерживания,
ОФВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ = обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостна хроматография,
КТ или кт = комнатная температура (температура окружающей среды, около 25°C),
насыщ. = насыщенный,
НТАБ = натрия триацетоксиборгидрид ($NaBH(OAc)_3$),
TBSCl или TBDMSCl = трет-бутилдиметилсилилхлорид,
TBS = трет-бутилдиметилсилил,
ТКЭФ·HCl = трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид,
ТЭА = триэтиламин (Et_3N),
ТФУ = трифторуксусная кислота,
ТГФ = тетрагидрофуран,
ТСХ = тонкослойная хроматография,
Val = валин.

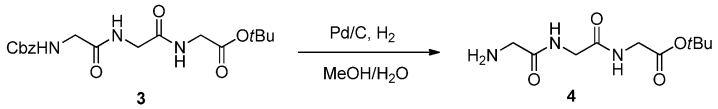
Пример 1. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноата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



1 2 3

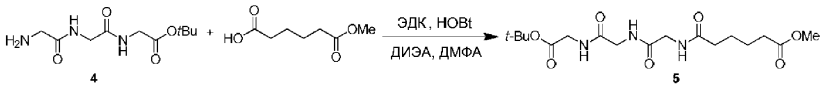
Стадия 1. Z-Gly-Gly-OH соединение 1 (5,0 г, 18,78 ммоль) и H-Gly-Ot-Bu·HCl соединение 2 (3,46 г, 20,66 ммоль) растворяли в ДМФА (37,6 мл). ЭДК·HCl (3,96 г, 20,66 ммоль) и ГОБт (2,88 г, 18,78 ммоль) добавляли в реакционную колбу с последующим добавлением ДИПЭА (8,18 мл, 46,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт в атмосфере Ar на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2, промывали насыщ. NH_4Cl, насыщ. $NaHCO_3$, затем водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0-5%) с получением чистого соединения 3 в виде белого твердого вещества (6,35 г, 89% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,18-8,13 (м, 2H), 7,48 (т, 1H, J=6,0 Гц), 7,37-7,36 (м, 3H), 7,34-7,32 (м, 1H), 5,04 (с, 2H), 4,09 (к, 1H, J=5,2 Гц), 3,74 (т, 4H, J=6,1 Гц),

3,67 (д, 2H, J=6,0 Гц), 3,17 (д, 2H, J=5,2 Гц), 1,41 (с, 9H). ЖХМС=4,28 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 324,15 (M-t-Bu+H).



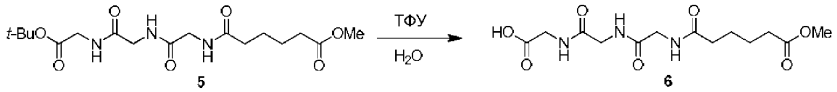
3 4

Стадия 2. Соединение 3 (6,3 г, 16,60 ммоль) растворяли в MeOH (52,7 мл) и воде (2,64 мл). Реакционную смесь продували Ar и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (влажный, 10%) (0,884 г, 0,830 ммоль). Затем барботировали H_2 из баллона на протяжении 1 мин. Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит, фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. К остатку добавляли CH_3CN (20 мл) и концентрировали. Операцию повторяли еще 2 раза с получением липкого твердого вещества. Остаток суспендировали в EtOAc/гексанах (2:1, 50 мл), фильтровали и промывали EtOAc/гексанами (1:1, 30 мл). Твердое вещество сушили под вакуумом/N_2 на протяжении 1 ч с получением соединения 4 в виде белого твердого вещества (3,66 г, 90% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,21-8,18 (м, 1H), 8,12 (шс, 1H), 3,76 (шс, 2H), 3,73 (д, 2H, J=6,0 Гц), 3,13 (с, 2H), 1,93 (шс, 2H), 1,41 (с, 9H).



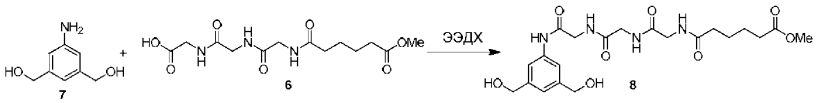
4 5

Стадия 3. Аминное соединение 4 (1,0 г, 4,08 ммоль) и монометиладипат (664 мкл, 4,48 ммоль) растворяли в ДМФА (13,59 мл). ЭДК·HCl (860 мг, 4,48 ммоль) и ГОБт (624 мг, 4,08 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (1,424 мл, 8,15 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (20 мл, 5:1) и промывали насыщ. NH_4Cl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (градиент, 0-20% MeOH/ДХМ) с получением чистого соединения 5 в виде белого твердого вещества (1,5 г, 95% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,17-8,06 (м, 3H), 3,74-3,71 (м, 6H), 3,59 (с, 3H), 2,32 (шт, 2H, J=6,9 Гц), 2,14 (шт, 2H, J=6,7 Гц), 1,52-1,49 (м, 4H), 1,41 (с, 9H).



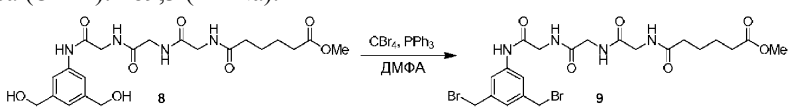
5 6

Стадия 4. Соединение 5 (1,5 г, 3,87 ммоль) перемешивали в ТФУ (5,97 мл, 77,0 ммоль) и деионизированной воде (300 мкл) при кт на протяжении ночи. CH_3CN (10 мл) добавляли в реакционную смесь и перемешивали на протяжении 5 мин. Смесь стала густой с большим количеством белого осадка. Добавляли больше CH_3CN (30 мл) и еще перемешивали на протяжении 5 мин. Смесь фильтровали и сушили под вакуумом/N_2 на протяжении 1 ч с получением чистого соединения 6 в виде белого твердого вещества (0,7 г, 55% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 12,56 (с, 1H), 8,16-8,06 (м, 3H), 3,73 (дт, 6H, J=8,6, 6,1 Гц), 3,59 (с, 3H), 2,32-2,29 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H), 1,51 (шт, 4H, J=3,5 Гц).



7 6 8

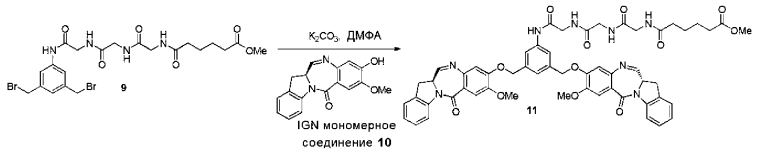
Стадия 5. Анилиновое соединение 7 (100 мг, 0,653 ммоль) и кислотное соединение 6 (227 мг, 0,685 ммоль) суспендировали в CH_2Cl_2/MeOH (4,35 мл/2,2 мл) при кт. Добавляли ЭЭДХ (323 мг, 1,306 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали, остаток суспендировали в EtOAc (15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали EtOAc (2×15 мл) и сушили под вакуумом/N_2 с получением соединения 8 в виде белого твердого вещества (260 мг, 85% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,74 (с, 1H), 8,21-8,19 (м, 2H), 8,11-8,08 (м, 1H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, J=5,7 Гц), 4,45 (д, 4H, J=5,6 Гц), 3,87 (д, 2H, J=5,8 Гц), 3,75 (дд, 4H, J=5,7, 13,4 Гц), 3,58 (с, 3H), 2,31-2,27 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H),1,52-1,48 (м, 4H). ЖХМС=0,886 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 489,3 (M+Na).



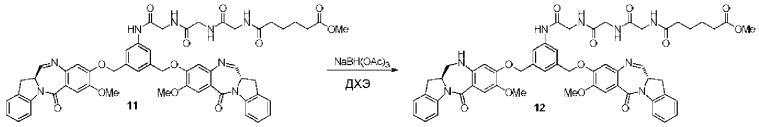
8 9

Стадия 6. Диольное соединение 8 (260 мг, 0,557 ммоль) и карбонтетрабромид (555 мг, 1,672 ммоль) растворяли в ДМФА (5,57 мл). Добавляли трифенилфосфин (439 мг, 1,672 ммоль) и перемешивали коричневую смесь под Ar при кт на протяжении 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (10:1, 30 мл) и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ,

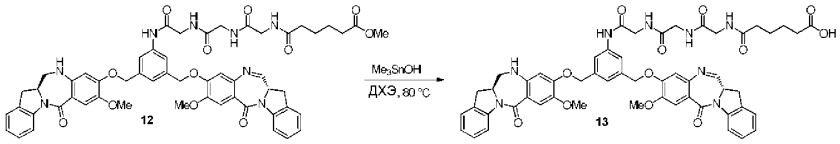
0-10%, градиент) с получением соединения 9 в виде желтого твердого вещества. Продукт суспендировали в CH_2Cl_2/EtOAc (1:10, 30 мл) и затем фильтровали. Твердое вещество промывали EtOAc и сушили под вакуумом/N_2 с получением чистого соединения 9 в виде почти белого твердого вещества (170 мг, 52% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,95 (с, 1H), 8,25-8,20 (м, 2H), 8,12-8,10 (м, 1H), 7,65 (с, 2H), 7,22 (с, 1H), 4,68 (с, 3H), 3,89 (д, 2H, J=5,8 Гц), 3,77 (дд, 4H, J=5,7, 7,4 Гц), 3,58 (с, 3H), 2,31-2,27 (м, 2H), 2,16-2,13 (м, 2H), 1,51-1,49 (м, 4H). ЖХМС=3,335 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 593,2 (M+H).



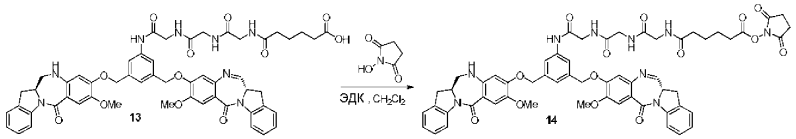
Стадия 7. Дибромидное соединение 9 (109 мг, 0,184 ммоль) и IGN мономерное соединение 10 (119 мг, 0,405 ммоль) растворяли в ДМФА (1,84 мл). Добавляли карбонат калия (63,6 мг, 0,460 ммоль) и перемешивали при кт на протяжении ночи. Воду (20 мл) добавляли в реакционную смесь для осаждения продукта. Суспензию перемешивали при кт на протяжении 5 мин и затем фильтровали и сушили под вакуумом/N_2 на протяжении 1 ч. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/CH_2Cl_2, градиент, 0-5%) с получением соединения 11 в виде желтого твердого вещества (160 мг, 60% выход, 70% чистота). ЖХМС=5,240 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1019,7 (M+H).



Стадия 8. Дииминовое соединение 11 (140 мг, 0,11 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтане (1,1 мл). Добавляли $NaBH(OAc)_3$ (23,29 мг, 0,11 ммоль) в реакционную смесь и перемешивали при кт на протяжении 1 ч. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 (30 мл) и гасили насыщ. водн. NH_4Cl раствором (15 мл). Слои разделяли и промывали соляным раствором, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, CH_3CN/H_2O, градиент, 35-55%) с получением моноиминного соединения 12 в виде белого пушистого твердого вещества (33 мг, 29% выход), и также извлекли исходное соединение 11 (25 мг). ЖХМС=7,091 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1021,7 (M+H).

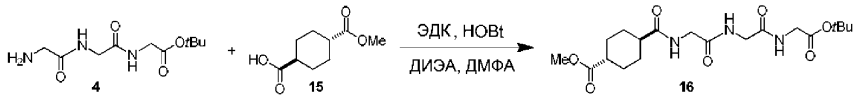


Стадия 9. Метилэфирное соединение 12 (33 мг, 0,029 ммоль) растворяли в ТГФ (1,09 мл) и воде (364 мкл). Добавляли LiOH (6,97 мг, 0,291 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении 1,5 ч. Реакционную смесь разбавляли H_2O (5 мл) и подкисляли 0,5 М водн. HCl до pH ~4. Водный слой экстрагировали CH_2Cl_2/MeOH (3:1, 3×20 мл). Комбинированные органические слои высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного соединения 13 в виде желтого твердого вещества (29 мг, 99% выход). ЖХМС=5,356 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1007,7 (M+H).



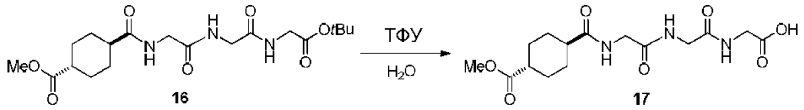
Стадия 10. ЭДК·HCl (22,08 мг, 0,115 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору кислотного соединения 13 (29 мг, 0,023 ммоль) и N-гидроксисукцинамида (21,21 мг, 0,184 ммоль) в CH_2Cl_2 (2,3 мл) при кт. Реакционную смесь перемешивали на протяжении 2 ч. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали водой (1×15 мл) и соляным раствором (1×15 мл). Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, CH_3CN/H_2O, градиент, 35-55%). Содержащие продукт фракции комбинировали и лиофилизировали с получением 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метилфенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-6-оксогексаноата, соединения 14, в виде белого пушистого твердого вещества (8 мг, 31% выход). ЖХМС=5,867 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1104,7 (M+H).

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



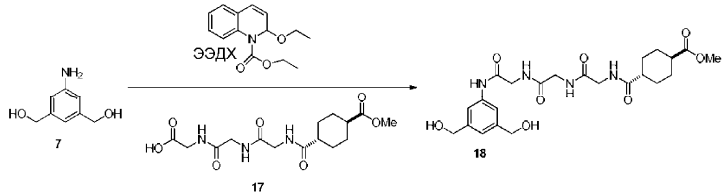
4 15 16

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



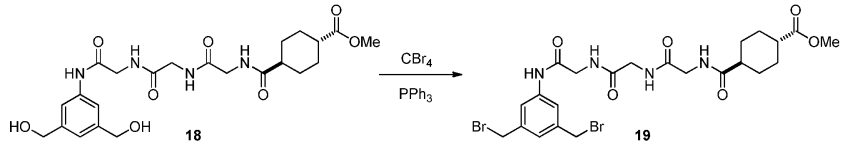
16 17

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



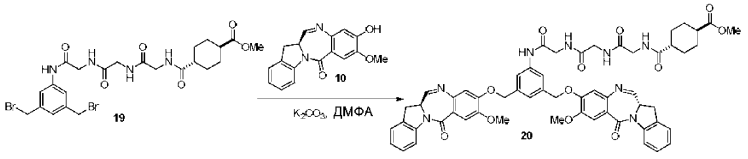
7 17 18

Стадия 3. Анилиновое соединение 7 (135 мг, 0,881 ммоль) и кислотное соединение 17 (331 мг, 0,925 ммоль) суспендировали в CH_2Cl_2/MeOH (2,9 мл/1,5 мл) при кт. Добавляли ЭЭДХ (436 мг, 1,763 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали, остаток суспендировали в EtOAc (15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали EtOAc (2×15 мл) и сушили под вакуумом/N_2 с получением соединения 18 в виде белого твердого вещества (330 мг, 61% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,73 (с, 1H), 8,18 (дт, 2H, J=6,0, 19,2 Гц), 8,09-8,01 (м, 2H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, J=5,7 Гц), 4,45 (д, 4H, J=5,6 Гц), 3,88-3,84 (м, 3H), 3,77-3,69 (м, 8H), 3,63 (с, 2H), 3,59 (с, 6H), 2,30-2,22 (м, 2H), 2,19-2,13 (м, 2H), 1,94-1,90 (м, 4H), 1,82-1,78 (м, 4H), 1,41-1,26 (м, 8H).



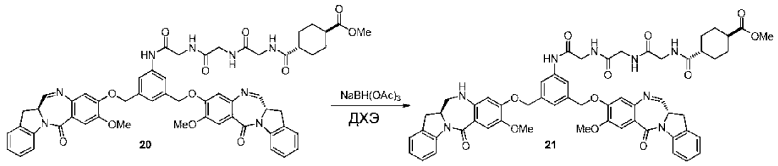
18 19

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

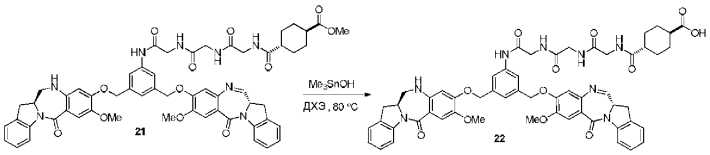


19 10 20

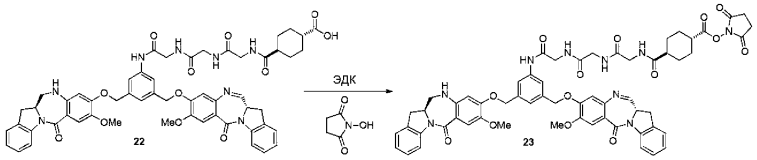
Стадия 5. Соединение 20 получали так же, как и соединение 11 в примере 1. Соединение 20 было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (264 мг, 60% выход). ЖХМС=4,831 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1045,20 (M+H).



Стадия 6. Соединение 21 получали так же, как и соединение 12 в примере 1. Соединение 21 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (51 мг, 31% выход). ЖХМС=5,127 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1047,30 (M+H).

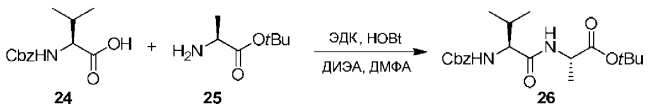


Стадия 7. Метилэфирное соединение 21 (48 мг, 0,046 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтане (3,06 мл). Триметилстаннанол (124 мг, 0,688 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80°C на протяжении ночи. Реакционную смесь охлаждали до кт и разбавляли водой (15 мл). Водный слой подкисляли до pH ~4 1 M HCl. Смесь экстрагировали CH_2Cl_2/MeOH (10:1, 3×20 мл). Комбинированные органические слои промывали соляным раствором, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток пробивали через короткую пластинку силикагеля и смывали CH_2Cl_2/MeOH (10:1, затем 5:1, 2×30 мл) и концентрировали. Кислотное соединение 22 было получено в виде желтого твердого вещества и использовалось в следующей стадии без дальнейшей очистки (48 мг, 100% выход). ЖХМС=5,338 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1033,7 (M+H).

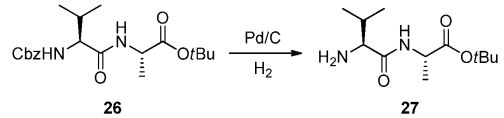


Стадия 8. Соединение 23 получали так же, как и соединение 13 в примере 1. (1r,4r)-2,5-Диоксопирролидин-1-ил 4-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамоил)циклогексанкарбоксилат, соединение 23, было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (8 мг, 19% выход). ЖХМС=6,007 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1130,8 (M+H).

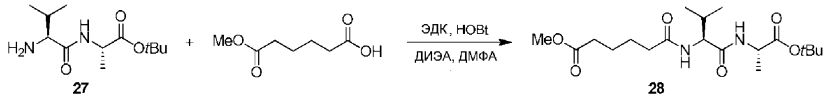
Пример 3. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-6-оксогексаноата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



Стадия 1. Z-Val-OH соединение 24 (3,0 г, 11,94 ммоль) и L-Ala-OtBu соединение 25 (1,907 г, 13,13 ммоль) растворяли в ДМФА (23,88 мл). ЭДК·HCl (2,52 г, 13,13 ммоль) и ГОБт (2,011 г, 13,13 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (4,59 мл, 26,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт под Ar на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали насыщ. $NaHCO_3$, насыщ. NH_4Cl, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-50%) с получением соединения 26 в виде белого твердого вещества (3,68 г, 81% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,39-7,29 (м, 5H), 6,29 (шд, 1H, J=6,9 Гц), 5,34 (шд, 1H, J=8,4 Гц), 5,11 (с, 2H), 4,45 (п, 1H, J=7,2 Гц), 4,02-3,98 (м, 1H), 2,18-2,09 (м, 1H), 1,56 (с, 9H), 1,37 (д, 3H, J=7,0 Гц), 0,98 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,93 (д, 3H, J=6,8 Гц). ЖХМС=5,571 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 323,25 (M-tBu+H).

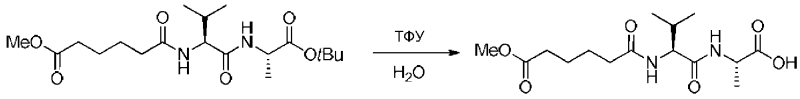


Стадия 2. Соединение 26 (3,68 г, 9,72 ммоль) растворяли в MeOH (30,9 мл) и воде (1,543 мл). Раствор продували Ar и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (10%, влажный, 0,517 г) в реакционную смесь. Затем на 1 мин барботировали H_2. Барботирование не прерывали и реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит, фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали с получением соединения 27 в виде белого твердого вещества (2,35 г, 99% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,79-7,77 (м, 1H), 4,50 (п, 1H, J=7,3 Гц), 3,27 (д, 1H, J=3,9 Гц), 2,34-2,26 (м, 1H), 1,49 (с, 9H), 1,40 (д, 3H, J=7,1 Гц), 1,01 (д, 3H, J=7,0 Гц), 0,86 (д, 3H, J=6,9 Гц).



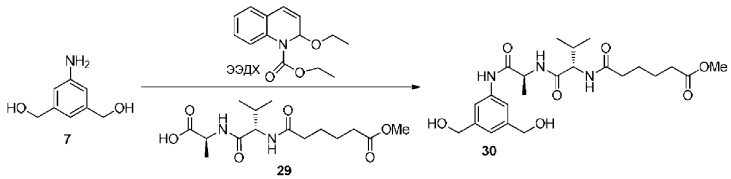
27 28

Стадия 3. Аминное соединение 27 (2,35 г, 9,62 ммоль) и монометиладипат (1,69 г, 10,58 ммоль) растворяли в ДМФА (32,1 мл). ЭДК·HCl (1,94 г, 10,10 ммоль) и ГОБт (1,47 г, 9,62 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (3,36 мл, 19,24 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (20 мл, 5:1) и промывали насыщ. NH_4Cl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-50%) с получением соединения 28 в виде белого твердого вещества (2,77 г, 75% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 6,29 (д, 1H, J=7,2 Гц), 6,12 (д, 1H, J=8,6 Гц), 4,43 (п, 1H, J=7,2 Гц), 4,27 (дд, 1H, J=6,4, 8,6 Гц), 3,66 (с, 3H), 2,35-2,31 (м, 2H), 2,26-2,23 (м, 2H), 2,12-2,03 (м, 1H), 1,70-1,63 (м, 4H), 1,46 (с, 9H), 1,36 (д, 3H, J=7,1 Гц), 0,95 (очевидный т, 6H, J=6,6 Гц).



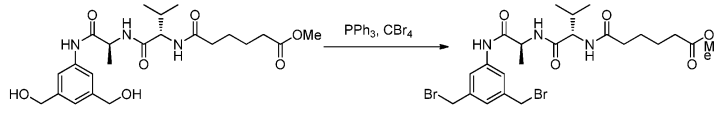
28 29

Стадия 4. ТФУ (8,28 мл, 108,0 ммоль) и воду (0,56 мл) добавляли к неразбавленному соединению 28 (2,77 г, 7,17 ммоль) при кт и перемешивали на протяжении 2,5 ч. CH_3CN (30 мл) добавляли в реакционную смесь и концентрировали. Операцию повторяли 2 раза с получением соединения 29 в виде бледно-желтого твердого вещества (2,0 г, 84% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,11 (шс, 1H), 7,29 (д, 1H, J=8,9 Гц), 7,14 (д, 1H, 6,8 Гц), 4,58 (п, 1H, J=7,1 Гц), 4,37 (т, 1H, J=8,7 Гц), 3,68 (с, 3H), 2,37-2,32 (м, 4H), 2,03-1,99 (м, 2H), 1,69-1,63 (м, 4H), 1,49 (д, 3H, J=7,2 Гц), 0,97 (д, 3H, J=4,8 Гц), 0,96 (д, 3H, J=4,8 Гц).



7 29 30

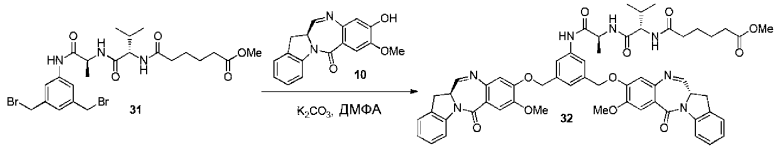
Стадия 5. Анилиновое соединение 7 (150 мг, 0,98 ммоль) и кислотное соединение 29 (340 мг, 1,03 ммоль) суспендировали в CH_2Cl_2/MeOH (3,26 мл, 1,62 мл) при кт. Добавляли ЭЭДХ (484 мг, 1,96 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Растворитель концентрировали, остаток суспендировали в EtOAc/Et_2O (15 мл, 15 мл) и фильтровали. Твердые вещества промывали Et_2O (2×15 мл) и сушили под вакуумом/N_2 с получением соединения 30 в виде белого твердого вещества (150 мг, 33% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,61 (с, 2H), 7,47 (д, 1H, J=7,1 Гц), 7,14 (с, 1H), 6,64 (д, 1H, J=8,0 Гц), 4,82-4,75 (м, 1H), 4,45-4,40 (м, 4H), 3,64 (с, 3H), 2,36-2,27 (м, 4H), 2,16-2,07 (м, 1H), 1,68-1,59 (м, 4H), 1,47 (д, 3H, J=7,0 Гц), 0,98 (д, 3H, J=3,6 Гц), 0,95 (д, 3H, J=4,8 Гц). ЖХМС=3,073 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 466,25 (M+H).



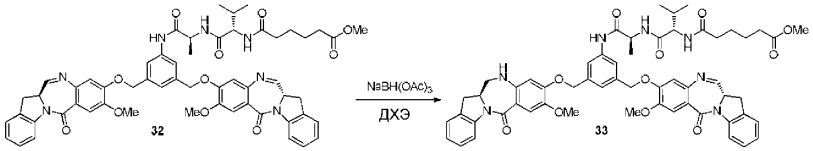
30 31

Стадия 6. Диольное соединение 30 (150 мг, 0,322 ммоль) и CBr_4 (321 мг, 0,967 ммоль) растворяли в ДМФА (3222 мкл). PPh_3 (254 мг, 0,967 ммоль) добавляли в реакционную смесь, при этом реакция окрасилась в красновато-розовый цвет с легким экзотермическим эффектом. Реакционную смесь перемешивали под Ar на протяжении 4 ч. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-100%) с получением соединения 31 в виде почти белого твердого вещества (473 мг, 75% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,19 (д, 1H, J=6,6 Гц), 7,85 (д, 1H, J=8,5 Гц), 7,64 (с, 2H), 7,21 (с, 1H), 4,68 (с, 3H), 4,37 (п, 1H, J=7,0 Гц), 4,18 (дд, 1H, J=7,2, 8,4 Гц), 3,58 (с, 3H), 2,32-2,29 (м, 2H), 2,33-2,12 (м, 2H), 2,01-1,91 (м, 1H), 1,53-1,49 (м, 4H), 1,31 (д, 3H, J=7,1 Гц), 0,89 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,85 (д, 3H, J=6,8 Гц). ЖХМС=5,259 мин (8-минутный ме-

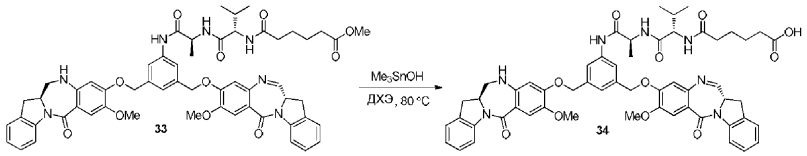
тод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 592,05 (M+H).



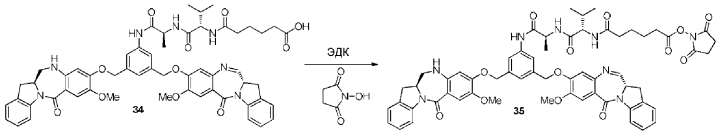
Стадия 7. Соединение 32 получали так же, как и соединение 11 в примере 1. Соединение 32 было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (162 мг, 57% выход, 70% чистота). ЖХМС=6,461 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1018,7 (M+H).



Стадия 8. Соединение 33 получали так же, как и соединение 12 в примере 1. Соединение 33 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (40 мг, 31% выход). ЖХМС=5,528 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1020,30 (M+H).

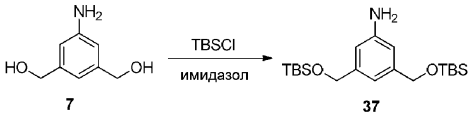


Стадия 9. Соединение 34 получали так же, как и соединение 22 в примере 2. Соединение 34 было получено в виде желтого твердого вещества после очистки с силикагелем (38 мг, 100% выход). ЖХМС = 5,211 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1006,35 (M+H).

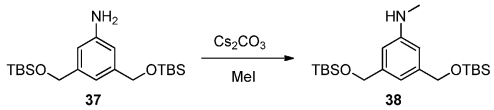


Стадия 10. Соединение 35 получали так же, как и соединение 14 в примере 1. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение 35 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (8 мг, 20% выход). ЖХМС=7,031 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1103,7 (M+H).

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

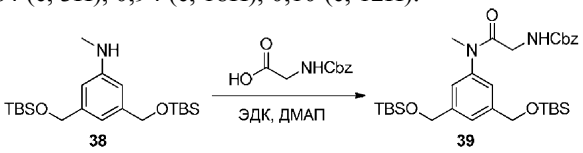


Стадия 1. (5-Амино-1,3-фенилен)диметанол соединение 7 (5,0 г, 32,6 ммоль) растворяли в ТГФ (65,3 мл). TBSCl (12,30 г, 82 ммоль) и имидазол (6,67 г, 98 ммоль) добавляли и перемешивали при кт на протяжении ночи под Ar. Реакционную смесь разводили EtOAc и промывали насыщ. NH_4Cl и соляным раствором, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-30%) с получением соединения 37 в виде желтого масла (13 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 6,71 (с, 1H), 6,60 (с, 2H), 4,65 (с, 4H), 0,94 (с, 18H), 0,10 (с, 12H).



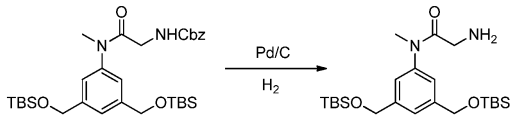
Стадия 2. Cs_2CO_3 (8,54 г, 26,2 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору анилинового соединения 37 (10 г, 26,2 ммоль) в ДМФА (52,4 мл). Добавляли метилйодид (1,474 мл, 23,58 ммоль), реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении 3 ч. Воду (10 мл) и EtOAc (30 мл) добавляли в реакционную смесь. Слои отделяли и экстрагировали EtOAc (2×). Органические слои промывали водой (4×), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-

хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-10%) с получением желаемого монометилированного продукта соединения 38 (3,8 г, 37% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 6,63 (с, 1H), 6,52 (с, 2H), 4,67 (с, 4H), 2,84 (с, 3H), 0,94 (с, 18H), 0,10 (с, 12H).



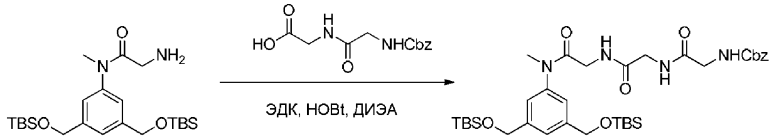
38 39

Стадия 3. Анилиновое соединение 38 (1,0 г, 2,53 ммоль) и Z-Gly-OH (0,582 г, 2,78 ммоль) растворяли в ДМФА (8,42 мл). ЭДК·HCl (1,21 г, 6,32 ммоль) и ДМАП (340 мг, 2,78 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80°C на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщ. $NaHCO_3$ и водой (2×), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 0-30-100%) с получением соединения 39 в виде желтого липкого твердого вещества (780 мг, 53% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,27 (м, 6H), 6,90 (с, 2H), 4,94 (с, 2H), 4,62 (с, 4H), 3,58 (с, 2H), 3,16 (s, 3H), 0,83 (с, 18H), 0,00 (с, 12H).



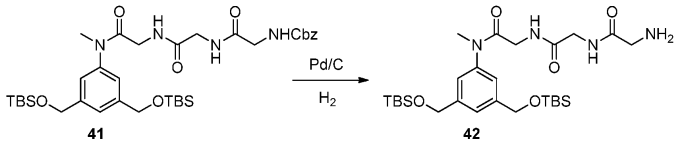
39 40

Стадия 4. Соединение 39 (1,26 г, 2,147 ммоль) растворяли в MeOH (6,82 мл) и ТГФ (6,8 мл) и раствор продували N_2. Добавляли Pd/C (10%, 0,228 г, 0,215 ммоль) и несколько минут барботировали H_2. Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит, промывали MeOH и концентрировали с получением чистого соединения 40 (1 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,41-7,30 (м, 2H), 7,27-7,21 (м, 1H), 7,06 (с, 2H), 4,65 (с, 4H), 3,23 (с, 3H), 3,12 (с, 2H), 0,82 (с, 18H), 0,00 (с, 12H).



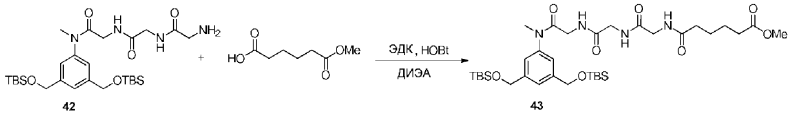
40 41

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



41 42

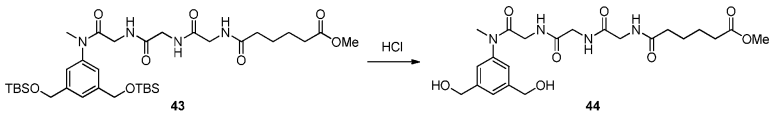
Стадия 6. Соединение 41 (994 мг, 1,418 ммоль) суспендировали в MeOH (6,65 мл) и воде (443 мкл) и продували N_2. Добавляли Pd/C ((10% влажный, 302 мг, 0,284 ммоль) и несколько минут барботировали H_2. Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона на протяжении ночи. Раствор фильтровали через целит, промывали MeOH и концентрировали с получением чистого соединения 42 (725 мг, 90% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,10-7,97 (м, 1H), 7,91-7,85 (м, 1H), 7,31-7,23 (м, 1H), 7,05 (с, 2H), 7,65 (с, 4H), 3,68-3,62 (м, 2H), 3,56-3,45 (м, 1H), 3,09 (с, 3H), 3,08-3,06 (м, 2H), 3,06-3,03 (м, 2H), 0,82 (с, 18H), 0,00 (с, 12H). ЖХМС=5,574 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 567,30 (M+H).



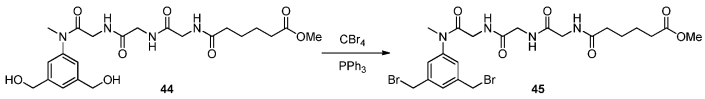
42 43

Стадия 7. Аминное соединение 42 (725 мг, 1,279 ммоль) и монометиладипат (246 мг, 1,535 ммоль) растворяли в ДМФА (6,5 мл). ЭДК·HCl (294 мг, 1,535 ммоль) и ГОБт (196 мг, 1,279 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (447 мкл, 2,56 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (20 мл) и промывали на-

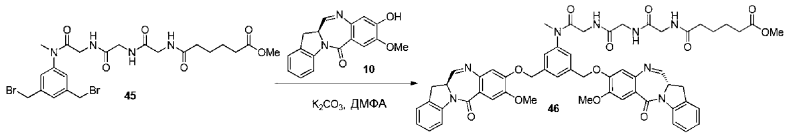
сыщ. NH_4Cl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/ДХМ, градиент, 0-10%) с получением соединения 43 (425 мг, 33% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,30 (с, 1H), 7,01 (с, 2H), 6,89-6,85 (м, 1H), 6,75-6,72 (м, 1H), 6,41-6,40 (м, 1H), 4,73 (с, 4H), 3,98-3,96 (м, 4H), 3,74 (шд, 2H, J=3,5 Гц), 3,66 (с, 3H), 3,27 (с, 3H), 2,33 (т, 2H, J=6,8 Гц), 2,28 (т, 2H, J=6,5 Гц), 0,94 (с, 18H), 0,11 (с, 12H). ЖХМС=7,709 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 709,35 (M+H).



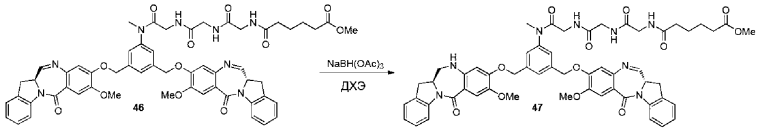
Стадия 8. Соединение 43 (422 мг, 0,417 ммоль) растворяли в ТГФ (1,89 мл) и воде (189 мкл). HCl (водная, 5 М) (833 мкл, 4,17 ммоль) добавляли и перемешивали при кт на протяжении 2,5 ч. Реакционную смесь концентрировали. ACN (~15 мл) добавляли к остатку и концентрировали. Повторяли операцию дважды с получением соединения 44 в виде белой пены (200 мг, 100% выход). ЖХМС=0,389 мин (8-минутный метод). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,09-8,04 (м, 2H), 7,93-7,90 (м, 1H), 7,30 (шс, 1H), 7,14 (с, 2H), 4,52 (с, 4H), 3,71-3,68 (м, 4H), 3,58 (с, 3H), 3,17 (шс, 3H), 2,22-2,18 (м, 2H), 2,15-2,12 (м, 2H), 1,53-1,47 (м, 4H).



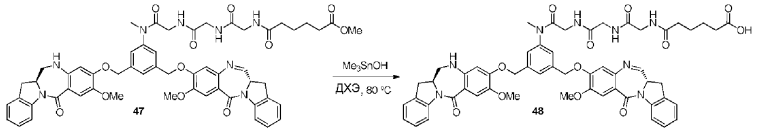
Стадия 9. Диольное соединение 44 (110 мг, 0,229 ммоль) и CBr_4 (228 мг, 0,687 ммоль) растворяли в ДМФА (2,29 мл). PPh_3 (180 мг, 0,687 ммоль) добавляли в реакционную смесь, при этом реакция окрасилась в красновато-розовый цвет с легким экзотермическим эффектом. Реакционную смесь перемешивали под Ar на протяжении 6 ч. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2/MeOH (10:1) и промывали водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (MeOH/CH_2Cl_2, градиент, 0-10%) с получением соединения 45 (30 мг, 22% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,46 (шс, 1H), 7,32-7,26 (м, 2H), 7,26-7,19 (м, 2H), 6,89-6,85 (м, 1H), 4,60 (д, 2H, J=3,6 Гц), 4,48 (д, 2H, J=3,9 Гц), 3,98 (д, 4H, J=5,1 Гц), 3,76 (шс, 1H), 3,67 (с, 3H), 3,30 (шс, 3H), 2,34 (шт, 2H, J=6,7 Гц), 2,30 (шт, 2H, J=6,6 Гц), 1,70-1,64 (м, 4H). ЖХМС=4,326 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 605,10 (M+H).



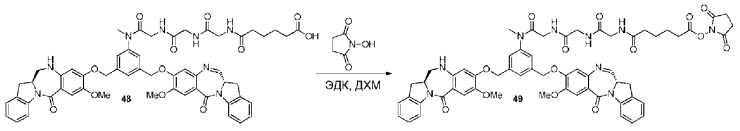
Стадия 10. Соединение 46 получали так же, как и соединение 11 в примере 1. Соединение 46 было получено в виде желтого твердого вещества после очистки (40 мг, 59% выход). ЖХМС=4,751 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1033,35 (M+H).



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



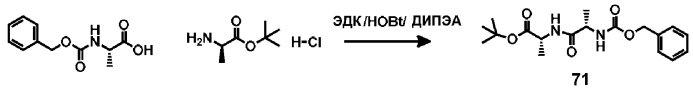
Стадия 12. Соединение 48 получали так же, как и соединение 22 в примере 2. Соединение 48 было получено в виде желтого твердого вещества после очистки с силикагелем (7 мг, 100% выход). ЖХМС=4,817 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1021,35 (M+H).



Стадия 13. Соединение 49 получали так же, как и соединение 14 в примере 1. 2,5-

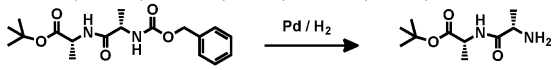
диоксопирролидин-1-ил 2-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-3,6,9,12-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазагептадекан-17-оат, соединение 49 было получено как белое твердое вещество после очистки C18 (6,5 мг, 74% выход). ЖХМС=5,805 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1118,7 (M+H).

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



71

Стадия 1. (S)-2-(((Бензилокси)карбонил)амино)пропановую кислоту (5 г, 22,40 ммоль) и (R)-трет-бутил 2-аминопропаноат гидрохлорид (4,48 г, 24,64 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (44,8 мл). Добавляли ЭДК·HCl (4,72 г, 24,64 ммоль), ГОБт (3,43 г, 22,40 ммоль) и затем ДИПЭА (9,75 мл, 56,0 ммоль). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. Сырое масло очищали хроматографией на силикагеле (гексаны/этилацетат), чтобы получить соединение 71 (5,6 г, 71% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,39-7,34 (м, 5H), 6,54 (с, 1H), 5,28 (с, 1H), 5,15 (с, 2H), 4,47-4,43 (м, 1H), 4,48 (с, 1H), 1,49 (с, 9H), 1,42-1,37 (м, 6H).



71 72

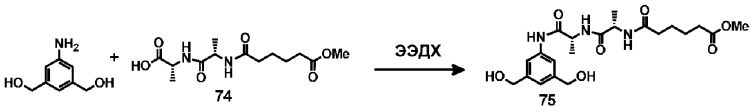
Стадия 2. Соединение 71 (5,6 г, 15,98 ммоль) растворяли в метаноле (50,7 мл) и воде (2,54 мл). Раствор продували аргоном на протяжении 5 мин. Медленно добавляли палладий-на-углероде (влажный, 10%) (0,850 г, 0,799 ммоль). Смесь перемешивали на протяжении ночи в атмосфере водорода. Раствор фильтровали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

72 73

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

73 74

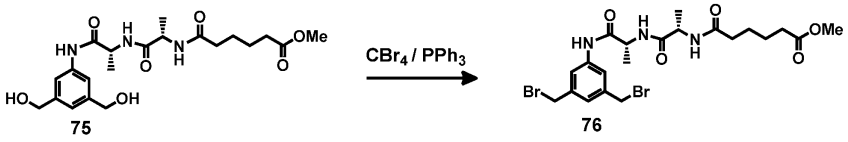
Стадия 4. Соединение 73 (5,91 г, 16,5 ммоль) перемешивали в ТФУ (25,4 мл, 330 ммоль) и деионизированной воде (1,3 мл) при кт на протяжении 3 ч. Реакционную смесь концентрировали ацетонитрилом и помещали под высокий вакуум до высыхания с получением сырого соединения 74 (4,99 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР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



74 75

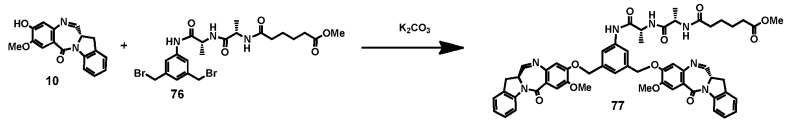
Стадия 5. Соединение 74 (4,8 г, 15,88 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (101 мл) и безводном метаноле (50,4 мл). (5-Амино-1,3-фенилен)диметанол (2,316 г, 15,12 ммоль) и ЭЭДХ (7,48 г, 30,2

ммоль) добавляли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель упаривали и сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение 75 (1,65 г, 25% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,68 (с, 1H), 8,29 (д, 1H, J=7,2 Гц), 8,11 (д, 1H, J=6,4 Гц), 7,52 (с, 2H), 6,97 (с, 1H), 5,15 (с, 2H), 4,45 (с, 4H), 4,39-4,32 (м, 1H), 4,28-4,21 (м, 1H), 3,57 (с, 3H), 2,30-2,27 (м, 2H), 2,17-2,13 (м, 2H), 1,54-1,45 (м, 4H) 1,30 (д, 3H, J=7,2 Гц), 1,20 (д, 3H, J=7,2 Гц). МС (m/z): 460,2 $(M+Na)^+$.



75 76

Стадия 6. Соединение 75 (0,486 г, 1,111 ммоль) и карбонтетрабромид (1,105 г, 3,33 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (11,11 мл). Добавляли трифенилфосфин (0,874 г, 3,33 ммоль) и смесь перемешивали в атмосфере аргона 4 ч. Реакционную смесь разводили ДХМ/MeOH (10:1) и промывали водой и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/MeOH), чтобы получить соединение 76 (250 мг, 40% выход), ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,82 (с, 1H), 8,38 (д, 1H, J=7,2 Гц), 8,17 (д, 1H, J=6,0 Гц), 7,76 (с, 2H), 7,22 (с, 1H), 4,66 (с, 4H), 4,38-4,31 (м, 1H), 4,25-4,19 (м, 1H), 3,56 (с, 3H), 2,30-2,27 (м, 2H), 2,18-2,15 (м, 2H), 1,53-1,51 (м, 4H), 1,32 (д, 3H, J=7,2 Гц), 1,21 (д, 3H, J=6,8 Гц).

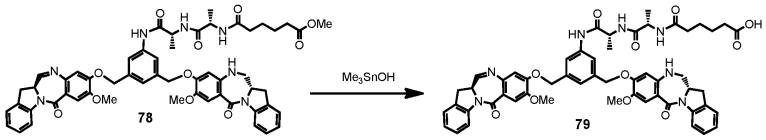


10 76 77

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

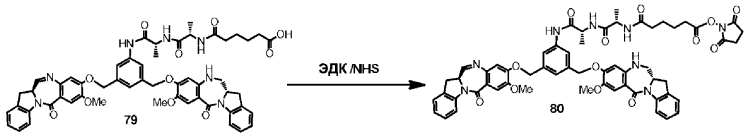
77 78

Стадия 8. Соединение 78 получали так же, как и соединение 12 в примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить соединение 78 (103 мг, 30% выход). ЖХМС=6,65 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 992,7 $(M+1)^+$.



78 79

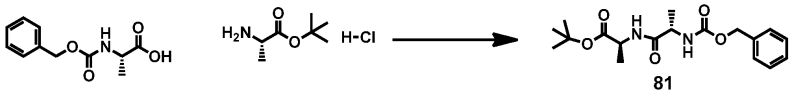
Стадия 9. Соединение 78 получали так же, как и 22 в примере 2. Сырой материал очищали с помощью силикагеля, чтобы получить соединение 79 (38 мг, 55% выход, 75% чистота). ЖХМС=5,83 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 978,6 $(M+1)^+$.



79 80

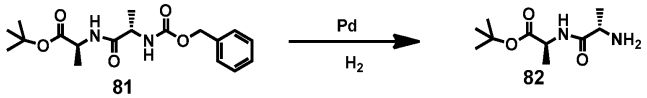
Стадия 10. Соединение 80 получали так же, как и соединение 14 в примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((R)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((R)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение 80 (6,5 мг, 30% выход). ЖХМС=6,53 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1075,7 $(M+1)^+$ и 1097,7 $(M+Na)^+$.

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



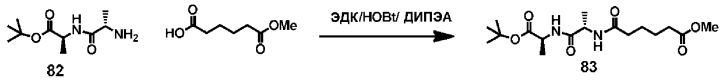
81

Стадия 1. (S)-2-(((Бензилокси)карбонил)амино)пропановой кислота (5 г, 22,40 ммоль) и (S)-трет-бутил 2-аминопропаноат гидрохлорид (4,48 г, 24,64 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (44,8 мл). Добавляли ЭДК·HCl (4,72 г, 24,64 ммоль), ГОБт (3,43 г, 22,40 ммоль) и ДИПЭА (9,75 мл, 56,0 ммоль). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия, водой и соляным раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. Сырое масло очищали хроматографией на силикагеле (гексаны/этилацетат), чтобы получить соединение 81 (6,7 г, 85% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,38-7,31 (м, 5H), 6,53-6,42 (м, 1H), 5,42-5,33 (м, 1H), 5,14 (с, 2H), 4,48-4,41 (м, 1H), 4,32-4,20 (м, 1H), 1,49 (с, 9H), 1,42 (д, 3H, J=6,8 Гц), 1,38 (д, 3H, J=7,2 Гц).



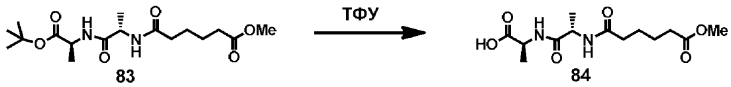
81 82

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



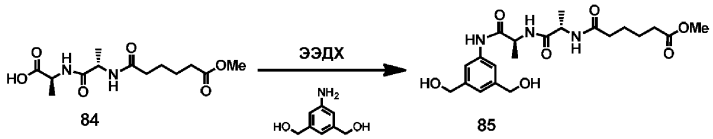
82 83

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



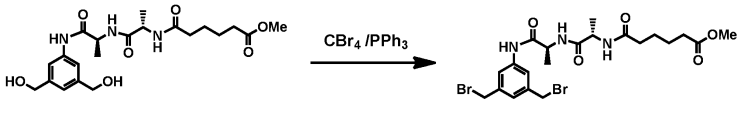
83 84

Стадия 4. Соединение 83 (5,91 г, 16,5 ммоль) перемешивали в ТФУ (28,6 мл, 372 ммоль) и деионизированной воде (1,5 мл) при кт на протяжении 3 ч. Реакционную смесь концентрировали ацетонитрилом и помещали под высокий вакуум, чтобы получить сырое соединение 84 в виде липкого твердого вещества (5,88 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,21 (д, 1H, J=6,8 Гц), 6,81 (д, 1H, J=7,6 Гц), 4,69-4,60 (м, 1H), 4,59-4,51 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 2,40-2,33 (м, 2H), 2,31-2,24 (м, 2H), 1,72-1,63 (м, 4H), 1,51-1,45 (м, 3H), 1,42-1,37 (м, 3H).



84 85

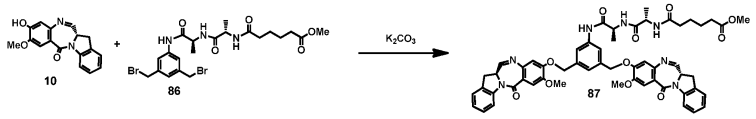
Стадия 5. Соединение 84 (5,6 г, 18,52 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (118 мл) и безводном метаноле (58,8 мл). (5-Амино-1,3-фенилен)диметанол (2,70 г, 17,64 ммоль) и ЭЭДХ (8,72 г, 35,3 ммоль) добавляли в реакционную смесь, перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель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



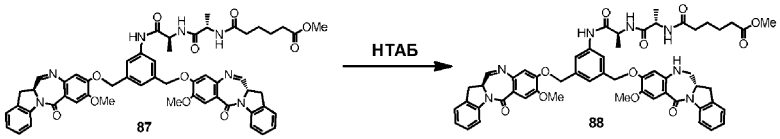
85 86

Стадия 6. Соединение 85 (0,52 г, 1,189 ммоль) и карбонтетрабромид (1,183 г, 3,57 ммоль) растворя-

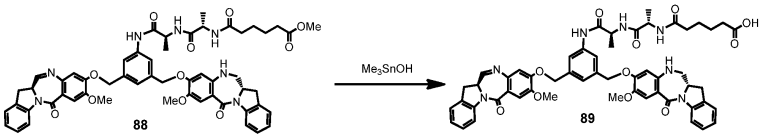
ли в безводном ДМФА (11,89 мл). Добавляли трифенилфосфин (0,935 г, 3,57 ммоль) и смесь перемешивали в атмосфере аргона 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ/MeOH (10:1) и промывали водой и соляным раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой материал очищали хроматографией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



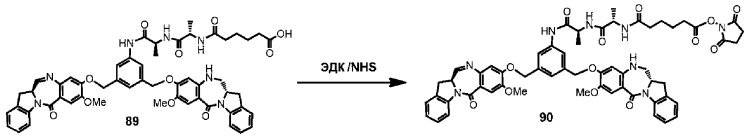
Стадия 7. Соединение 87 получали так же, как и соединение 11 в примере 1. Сырой материал очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение 87 (336 мг, 74% выход). ЖХМС=5,91 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 990,6 $(M+1)^+$.



Стадия 8. Соединение 88 получали так же, как и соединение 12 в примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить соединение 88 (85,5 мг, 25% выход). ЖХМС=6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 992,6 $(M+1)^+$.

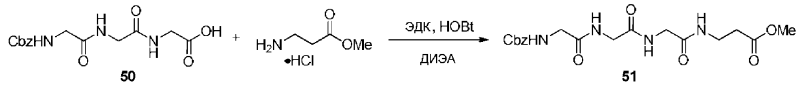


Стадия 9. Соединение 88 получали так же, как и 22 в примере 2. Сырой материал пропускали через силикагелевую пробку, чтобы получить соединение 89 (48,8 мг, 80% выход). ЖХМС=5,89 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 978,6 $(M+1)^+$.

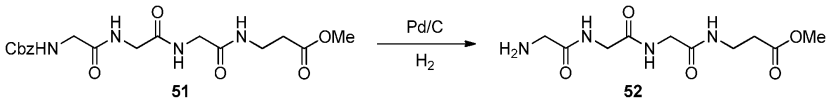


Стадия 10. Соединение 90 получали так же, как и 14 в примере 1. Сырой материал очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, ацетонитрил/вода), чтобы получить 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((R)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-6-оксогексаноат, соединение 90 (8,2 мг, 30% выход). ЖХМС=6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1075,4 $(M+1)^+$.

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

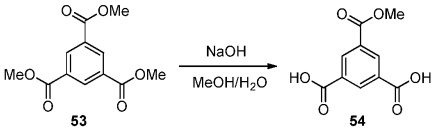


Стадия 1. Z-Gly-Gly-GlyOH соединение 50 (1,0 г, 3,09 ммоль) и Р-аланина метиловый эфир·HCl (453 мг, 3,25 ммоль) растворяли в ДМФА (12,37 мл). ЭДК·HCl (623 мг, 3,25 ммоль) и ГОБт (497 мг, 3,25 ммоль) добавляли в реакционную смесь с последующим добавлением ДИЭА (1,08 мл, 6,19 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт на протяжении ночи. На следующий день образовалось много белого осадка. Реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2/MeOH (5:1, 30 мл) и промывали насыщ. $NaHCO_3$, насыщ. NH_4Cl и соляным раствором. Органический слой стал мутным. Добавили EtOAc (15 мл) к органическому слою, чтобы осадить продукт. Смесь фильтровали и твердое вещество промывали водой (10 мл) и CH_3CN (2×15 мл) с получением чистого соединения 51 в виде белого порошка (880 мг, 70% выход) без очистки. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,16 (шт, 1H, J=5,4 Гц), 8,11 (шт, 1H, J=5,6 Гц), 7,88-7,85 (м, 1H), 7,49 (шт, 1H, J=5,5 Гц), 7,40-7,31 (м, 5H), 5,04 (с, 2H), 3,74 (д, 2H, J=5,5 Гц), 3,67 (т, 4H, J=6,2 Гц), 3,60 (с, 3H), 3,29 (к, 1H, J=6,4 Гц), 2,47 (т, 3H, J=6,9 Гц).



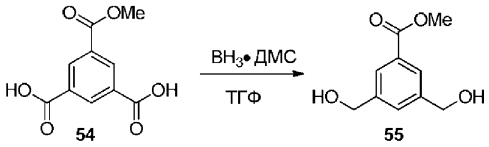
51 52

Стадия 2. Соединение 51 (876 мг, 2,145 ммоль) растворяли в MeOH (20,4 мл) и воде (1,02 мл) и продували Ar. Раствор дегазировали 5 мин, медленно добавляли Pd/C (10%, влажный 50% водн., 228 мг). На 1 мин барботировали из баллона H_2. Реакционную смесь перемешивали в токе H_2 из баллона на протяжении ночи. H_2O (~3 мл) добавляли в реакционную смесь для растворения всех образованных белых твердых веществ. Раствор фильтровали через целит, фильтрационный осадок промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. Остаток растворяли в CH_3CN (20 мл) и концентрировали. Процедуру повторяли 2 раза. Полученное резинистое твердое вещество осаждали добавлением CH_3CN (~15 мл). Густую белую суспензию перемешивали на протяжении 10 мин, фильтровали и промывали CH_3CN. Твердое вещество сушили под вакуумом/N_2 1,5 ч с получением соединения 52 в виде белого твердого вещества (450 мг, 76% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,18-8,12 (м, 2H), 7,88 (т, 1H, J=5,4 Гц), 3,75 (с, 2H), 3,65 (д, 2H, J=5,9 Гц), 3,6 (с, 3H), 3,33-3,27 (м, 4H), 2,47 (т, 2H, J=7,0 Гц), 1,94 (шс, 1H).



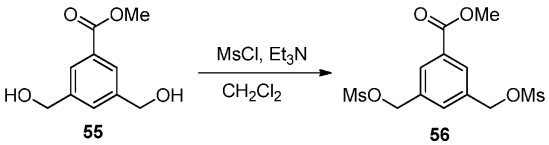
53 54

Стадия 3. NaOH (1,665 г, 41,6 ммоль) добавляли в перемешиваемый раствор триметилбензол-1,3,5-трикарбоксилата, соединение 53 (5 г, 19,82 ммоль) в MeOH (66,1 мл) и воде (13,22 мл). Реакционную смесь нагревали с дефлегматором под Ar на протяжении 3 ч. Образовалось много белого осадка. Раствор охлаждали до кт и разбавляли H_2O, пока все твердые вещества не растворились. Смесь подкисляли до pH ~2-3 водной 5 N HCl, экстрагировали EtOAc (3×), сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Сырой продукт растворяли в горячем EtOAc (50 мл) и медленно охлаждали до кт. Осадок фильтровали (осадок был побочным продуктом, а не продуктом). Маточник концентрировали с получением соединения 54 в виде белого твердого вещества (3,45 г, 78% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,62 (шс, 2H), 8,65 (с, 3H), 3,93 (с, 3H). ЖХМС=3,209 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 244,90 (M+H).



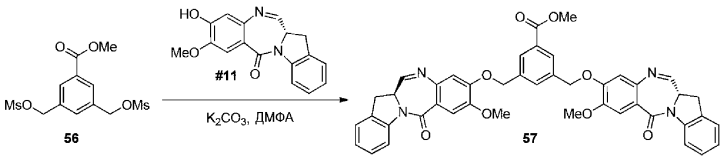
54 55

Стадия 4. Дикислотное соединение 54 (1,0 г, 4,46 ммоль) растворяли в ТГФ (17,84 мл). Раствор охлаждали до 0°C и BH_3·ДМС (2M в ТГФ) (8,92 мл, 17,84 ммоль) добавляли медленно под Ar. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 5 мин, а затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакция была открыта для воздуха и медленно гасилась MeOH с последующим медленным добавлением H_2O до тех пор, пока не перестали наблюдаться выделения газа. Смесь экстрагировали EtOAc (2×) и слои разделяли. Органические слои промывали водным ~3% H_2O_2, водн. раствором лимонной кислоты и соляным раствором, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 20-100%) с получением диольного соединения 55 в виде белого твердого вещества (385 мг, 44% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,81 (с, 2H), 7,52 (с, 1H), 5,33 (шс, 2H), 4,56 (с, 4H), 3,86 (с, 3H).



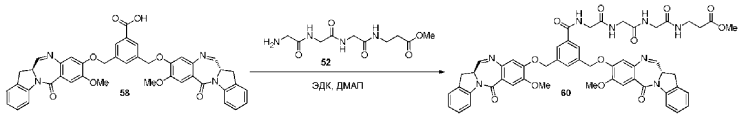
55 56

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

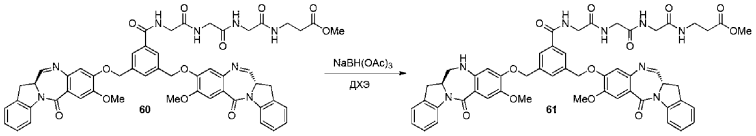


Стадия 6. Димезилатное соединение 56 (435 мг, 1,11 ммоль) растворяли в ДМФА (5,55 мл). IGN мономер, соединение 10 (719 мг, 2,444 ммоль) добавляли с последующим добавлением K_2CO_3 (384 мг, 2,78 ммоль) и перемешивали при кт в атмосфере Ar на протяжении ночи. Воду (20 мл) добавляли для осаждения продукта. Суспензию перемешивали на протяжении 5 мин и затем фильтровали и сушили под вакуумом/N_2 на протяжении 1,5 ч. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны, градиент, 50-100%; затем 5% MeOH/ДХМ) с получением соединения 57 в виде желтого твердого вещества (535 мг, 64% выход, 2 стадии). ЖХМС=6,973 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 749,4 (M+H).

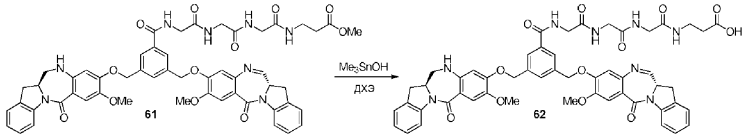
Стадия 7. Соединение 57 (100 мг, 0,134 ммоль) растворяли в ДХЭ (1,34 мл). Триметилстаннанол (362 мг, 2,003 ммоль) добавляли в реакционную смесь и нагревали до 80°C на протяжении ночи. Реакционную смесь охлаждали до кт и разбавляли водой. Водный слой подкисляли до pH ~4 1 M HCl и экстрагировали ДХМ (3×),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



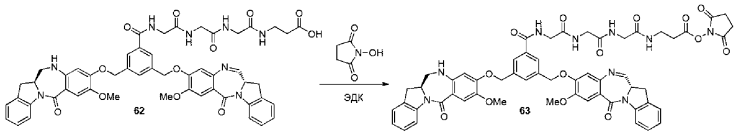
Стадия 8. Кислотное соединение 58 (80 мг, 0,087 ммоль) и аминное соединение 52 (36 мг, 0,131 ммоль) растворяли в ДМФА (871 мкл). ЭДК·HCl (25 мг, 0,131 ммоль) и ДМАП (10,6 мг, 0,087 ммоль) добавляли и перемешивали при кт 4 ч. Воду (4 мл) добавляли для осаждения продукта. Суспензию перемешивали на протяжении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



Стадия 9. Соединение 61 получали так же, как и соединение 12 в примере 1. Соединение 61 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (8 мг, 25% выход). ЖХМС=5,421 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 993,7 (M+H).



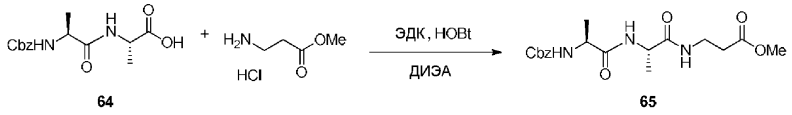
Стадия 10. Соединение 62 получали так же, как и соединение 22 в примере 2. Сырое соединение 62 было получено в виде желтого твердого вещества после силикагелевой очистки (13 мг, 90% выход). ЖХМС=4,693 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 979,35 (M+H).



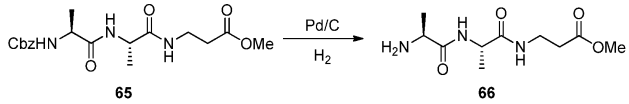
Стадия 11. Соединение 63 получали так же, как и соединение 14 в примере 1. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил 1-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4] диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)-1,4,7,10-тетраоксо-2,5,8,11-тетраазатетрадекан-14-оат, соедине-

ние 63 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (4 мг, 31% выход). ЖХМС=5,495 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 1076,7 (M+H).

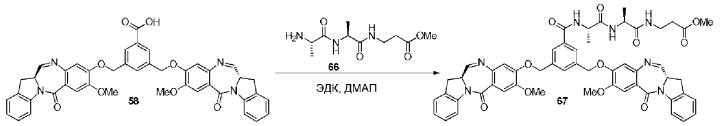
Пример 8. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((S)-2-((S)-2-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)бензамидо) пропанамидо)пропанамидо)пропаноата (соединение 70)



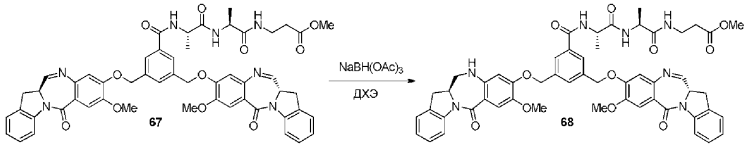
Стадия 1. Z-L-Ala-L-Ala-OH соединение 64 (3,0 г, 10,19 ммоль) и β-аланина метиловый эфир·HCl (1,565 г, 11,21 ммоль) растворяли в ДМФА (20,39 мл). ЭДК·HCl (2,150 г, 11,21 ммоль) и ГОБт (1,561 г, 10,19 ммоль) добавляли с последующим добавлением ДИПЭА (4,44 мл, 25,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кт под Ar на протяжении ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщ. NH_4Cl, насыщ. $NaHCO_3$ и солевым раствором. Гексаны добавляли к органическому слою, при этом раствор стал мутным и выпал осадок. Суспензию перемешивали на протяжении нескольких минут, фильтровали и отмывали твердые вещества EtOAc/гексаны (3:1). Твердое вещество сушили под вакуумом/N_2 с получением чистого соединения 65 в виде белого твердого вещества (3,11 г, 80% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,91 (д, 2H, J=7,0 Гц), 7,46 (д, 1H, J=7,4 Гц), 6,39-7,30 (м, 5H), 5,02 (д, 2H, J=2,3 Гц), 4,20 (п, 1H, J=7,2 Гц), 4,04 (п, 1H, J=7,3 Гц), 3,59 (с, 3H), 3,30-3,22 (м, 1H), 2,45 (т, 2H, J=6,8 Гц), 1,18 (различимый т, 6H, J=7,2 Гц). ЖХМС=3,942 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 380,10 (M+H).



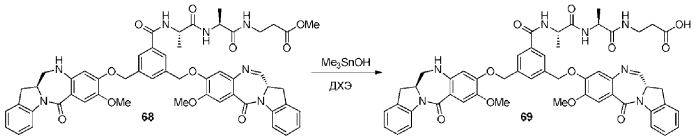
Стадия 2. Соединение 65 (1,0 г, 2,64 ммоль) растворяли в метаноле (12,55 мл), воде (0,628 мл) и ТГФ (2 мл). Раствор продували Ar и дегазировали на протяжении 5 мин. Медленно добавляли Pd/C (10%, влажный 50% водн., 0,140 г). На 1 мин барботировали из баллона H_2 и реакционную смесь дальше перемешивали в токе H_2 (1 атм) из баллона на протяжении ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит, промывали MeOH (30 мл) и концентрировали. CH_3CN (15 мл) добавляли к остатку и концентрировали. Процедуру повторили 2 раза с получением соединения 66 в виде почти белого твердого вещества (650 мг, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,03-7,99 (м, 2H), 4,24-4,18 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,31-3,22 (м, 5H), 2,46 (т, 2H, J=6,8 Гц), 1,17 (д, 3H, J=7,0 Гц), 1,12 (д, 3H, J=6,9 Гц).



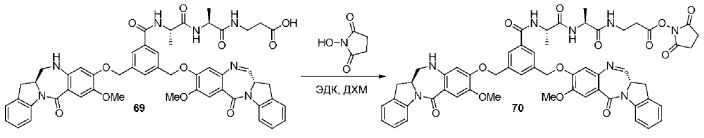
Стадия 3. Соединение 67 получали так же, как и 60 в примере 7. Соединение 67 получили в виде желтого твердого вещества после флэш-хроматографии на силикагеле (69 мг, 53% выход). ЖХМС=4,843 мин (8-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 962,25 (M+H).



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

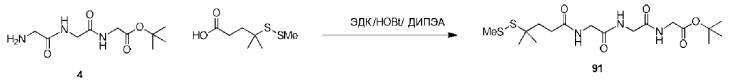


Стадия 5. Соединение 69 получали так же, как и соединение 22 в примере 2. Сырое соединение 69 было получено в виде желтого твердого вещества после силикагелевой очистки (13 мг, 100% выход). ЖХМС=5,640 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса (ЭРИ$^+$): 950,4 (M+H).



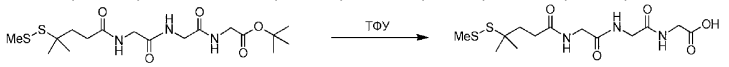
Стадия 6. Соединение 70 получали так же, как и соединение 14 в примере 1. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-3-((S)-2-((S)-2-(3-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-12a,13-дигидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)бензамидо)пропанамидо)пропанамидо)пропаноат, соединение 70 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (5 мг, 35% выход). ЖХМС=6,138 мин (15-минутный метод). Наблюдаемая масса ($ЭРИ^+$): 1047,4 (M+H).

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



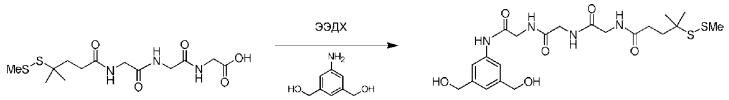
4 91

Стадия 1. Соединение 4 (2,0 г, 8,15 ммоль) и 4-метил-4-(метилдисульфанил)пентановую кислоту (1,743 г, 8,97 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (27,2 мл). ЭДК·HCl (1,719 г, 8,97 ммоль) и ГОБт (1,249 г, 8,15 ммоль) добавляли с последующим добавлением ДИПЭА (2,85 мл, 16,31 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре всю ночь. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном/метанолом (5:1) и затем промывали насыщенным хлоридом аммония, насыщенным бикарбонатом натрия и соляным раствором. Сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Сырое масло обезвоживали азеотропной перегонкой с ацетонитрилом (3×), затем сушили под высоким вакуумом при 35°C около 1,5 ч, чтобы получить соединение 91, которое использовали в следующей стадии без дальнейшей очистки. (3,44 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,18-8,09 (м, 3H), 3,76-3,68 (м, 6H), 2,41 (с, 3H), 2,28-2,21 (м, 2H), 1,84-1,77 (м, 2H), 1,41 (с, 9H), 1,25 (с, 6H).



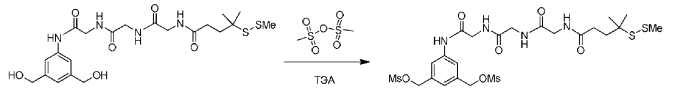
91 92

Стадия 2. Соединение 91 (3,44 г, 8,15 ммоль) перемешивали в ТФУ (12,56 мл, 163 ммоль) и деионизированной воде (0,65 мл) при кт на протяжении 3,5 ч. Реакционную смесь разбавляют ацетонитрилом и упаривают досуха. Сырое твердое вещество суспендировали с этилацетатом, фильтровали и промывали этилацетатом, а затем дихлорметан/метанолом (1:1), чтобы получить соединение 92 (2,98 г, 100% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 8,19-8,08 (м, 3H), 3,80-3,68 (м, 6H), 2,41 (с, 3H), 2,28-2,20 (м, 2H), 1,85-1,76 (м, 2H), 1,25 (с, 6H).



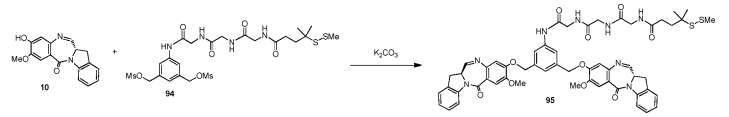
92 93

Стадия 3. Соединение 92 (1,74 г, 4,76 ммоль) растворяли в дихлорметане (30,2 мл) и метаноле (15,11 мл). N-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (2,243 г, 9,07 ммоль) и (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (0,695 г, 4,53 ммоль) добавляли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Растворитель удаляли и добавляли этилацетат. Твердое вещество фильтровали через целит и промывали этилацетатом, а затем метанолом. Фильтрат упаривали и очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/метанол), чтобы получить соединение 93 (569 мг, 25% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,74 (с, 1H), 8,24-8,15 (м, 3H), 7,45 (с, 2H), 6,96 (с, 1H), 5,17 (т, 2H, J=5,6 Гц), 4,45 (д, 4H, J=5,6 Гц), 3,87 (д, 2H, J=6,0 Гц), 3,77 (д, 2H, J=6,0 Гц), 3,73 (д, 2H, J=5,6 Гц), 2,40 (с, 3H), 2,28-2,21 (м, 2H), 1,83-1,76 (м, 2H), 1,24 (с, 6H).



93 94

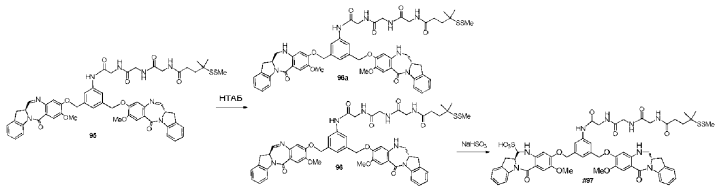
Стадия 4. Соединение 93 (305 мг, 0,609 ммоль) суспендировали в безводном ДХМ (5,992 мл), безводный ДМФА добавляли до достижения гомогенности раствора (~2,5 мл). Раствор охлаждали до -10°C на бане ацетон/сухой лед. Триэтиламин (0,425 мл, 3,05 ммоль) добавляли с последующим добавлением метансульфонового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



10 94 95

Стадия 5. Соединение 95 получали так же, как и соединение 57 в примере 7. Сырое твердое вещест-

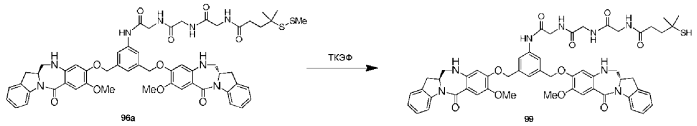
во растворяли в смеси дихлорметан/метанол (10: 1), промывали водой и органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли в вакууме и очищали хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол), чтобы получить соединение 95 (445 мг, 42% выход, 54% чистота). ЖХМС=6,64 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1053,4 $(M+1)^+$ и 1051,3 $(M-1)^-$.



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

Стадия 7. К перемешиваемому раствору соединения 97 (54 мг, 0,047 ммоль) в CH_3CN (3,85 мл) добавляли свежеприготовленный буферный раствор ТКЭФ/pH 6,5 (ТКЭФ·HCl (46,7 мг) растворяли в нескольких каплях деионизированной воды с последующим добавлением по каплям насыщенного бикарбоната натрия до pH ~6,5. Раствор разбавляли 0,55 мл pH 6,5, 1 М буферного раствора фосфата натрия и метанола (2,75 мл). Смесь перемешивали при кт 3 ч и затем замораживали и лиофилизировали. Твердое вещество очищали ОФВЭЖХ (C18, ацетонитрил/вода), чтобы получить (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-меркапто-4-метилпентанамидо)ацетамидо)ацетамидо)ацетамидо)-5-((((S)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)бензил)окси)-8-метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-12-сульфоновую кислоту, соединение 98 (2 мг, 4% выход). ЖХМС=4,32 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1089,3 $(M-1)^-$.

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



Соединение 99 получали так же, как и 98 в примере 9. N-(2-((2-((2-((3,5-бис-((((S)-8-Метокси-6-оксо-11,12,12a,13-тетрагидро-6H-бензо[5,6][1,4]диазепино[1,2-a]индол-9-ил)окси)метил)фенил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-4-меркапто-4-метилпентанамид, соединение 99 было получено в виде белого твердого вещества после очистки C18 (6,3 мг, 27% выход). ЖХМС=7,26 мин (15-минутный метод). МС (m/z): 1033,5 $(M+Na)^+$.

Пример 11. Получение huMOV19-14.

Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 8 мол.экв. соединения 14 (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 15% об./об. ДМА (N,N-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 6 ч при 25°C.

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

В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 3,0 молекул IGN91, связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\varepsilon_{330\ нм}$= 15280 $см^{-1}М^{-1}$ и $\varepsilon_{280\ нм}$= 30115 $см^{-1}М^{-1}$ для соединения 14, и $\varepsilon_{280\ нм}$= 201400 $см^{-1}М^{-1}$ для антитела huMOV19), 90% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгировавшего соединения 14 (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 0,78 мг/мл. Ана-

лизом гель-чипов было установлено, что >87% сконъюгированного антитела не повреждено. Данные МС-спектрометрии показаны на фиг. 7А.

Пример 12. Получение huMOV19-сульфо-SPDB-98.

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

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

В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 3,7 молекул соединения 98, связанных на антитело (методом SEC с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\varepsilon_{330\ нм}$= 15484 $см^{-1}М^{-1}$ и $\varepsilon_{280\ нм}$= 30115 $см^{-1}М^{-1}$ для соединения 98, и $\varepsilon_{280\ нм}$=201400 $см^{-1}М^{-1}$ для антитела huMOV19), 99% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии) и конечную концентрацию белка 0,18 мг/мл. Данные МС-спектрометрии показаны на фиг. 7А.

Пример 13. Получение huMOV19-35.

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

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

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

Пример 14. Получение huMOV19-63.

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

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

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

Пример 15. Получение huMOV19-80.

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

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

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

Пример 16. Получение huMOV19-90.

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

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

Пример 17. Получение huMOV19-49.

Реакционной смеси, содержащей 2,0 мг/мл антитела huMOV19 и 5 мол.экв. соединения 49 (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:вода) в 50 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 10% об./об. ДМА (N,N-диметилацетамид) совместного растворителя, позволили конъюгировать 4 ч при 25°C.

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

В очищенном конъюгате обнаружили в среднем 2,8 молекул соединения 49 связанных на антитело (методом UV-Vis с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\varepsilon_{330\ нм}$= 15280 $см^{-1}М^{-1}$ и $\varepsilon_{280\ нм}$= 30115 $см^{-1}М^{-1}$ для соединения 49, и $\varepsilon_{280\ нм}$= 201400 $см^{-1}М^{-1}$ для антитела huMOV19), 94% мономера (с помощью эксклюзионной хроматографии), <0,1% несконъюгировавшего соединения 49 (методом осаждения ацетоном, обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом) и конечную концентрацию белка 1,5 мг/мл. Анализом гель-чипов было установлено, что >95% сконъюгированного антитела не повреждено. Данные МС-спектрометрии показаны на фиг. 7C.

Пример 18. Получение huMOV19-сульфо-SPDB-99.

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

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

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

Пример 19. Получение huMOV19-70.

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

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

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

Пример 20. Получение huMOV19-23.

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

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

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

Пример 21. Исследование аффинности конъюгатов методом проточной цитометрии huMOV19-14, huMOV19-90 и huMOV19-107 100 мкл/лунку конъюгата huMOV19-14, huMOV19-90 или huMOV19-107 или антитела.

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

Анализ связывания повторили для конъюгата huMOV19-90, и данные показаны на фиг. 15B.

Как показано на фиг. 1, 15A, 15B и 20, конъюгаты связываются с поверхностью клеток T47D, экспрессирующих антиген-мишень, аналогично неконъюгированному антителу в проточной цитометрии, тем самым демонстрируя, что связывание не зависит от процесса конъюгации.

Пример 22. Анализ цитотоксичности конъюгата huMOV19-14.

100 мкл/лунку конъюгата huMOV19-14 разводили в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) в 96-луночный планшет (Corning, плоское дно) при исходных концентрациях $3,5\times10^{-9}$М до $3,5\times10^{-8}$ М в трех экземплярах и серийно разводили в 3 раза в вышеупомянутых средах при температуре окружающей среды. KB клетки (буккальная эпителиальная опухоль), выращиваемые в EMEM (ATCC), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies), промывали один раз в PBS и отбирали с 0,05% трипсин-ЭДТА (Life Technogies). Клетки KB ресуспендировали в питательной среде (см. выше), чтобы нейтрализовать действие трипсина, и под-

считывали на счетчике Coulter. 100 мкл/мл 1×10^3 клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и инкубировали в 37° инкубаторе с 5% CO_2 в течение 5 дней с и без 1 мкМ блокирующего анти-FOLR1 антитела (huMOV19). Общий объем 200 мкл/лунку. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 20 мкл/лунку WST-8 (Dojindo) и позволили эффекту развиться в течение 2 ч. Поглощение считывали на планшет-ридере при 450 и 620 нм. Поглощение при 620 нм вычитали из поглощения при 450 нм. Фон в лунках, содержащих только носитель, дополнительно вычитают из скорректированных значений спектральной поглощательной способности и подсчитывают в Excel фракцию выживших (SF) необработанных клеток. XY график концентрации ADC (M) по сравнению с SF был создан при помощи Graph Pad Prism.

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

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

100 мкл/лунку huMOV19-14 или huMOV19-90 разводили в RPMI-1640 (Life Technologies), дополненную термоинактивированной 10% FBS (Life Technologies), 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) и βME (Life Technologies) на 96-луночном планшете (Falcon, круглодонный) в концентрациях от 1 e-10 M до 4 e-10 M в шестикратном повторении. 300,19 клетки (мышиные), экспрессирующие рекомбинантный FOLR1 (FR1 # 14) или без экспрессионного вектора (родительские), подсчитывали на счетчике Coulter. 50 мкл/мл 1000 FR1 # 14 клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, 50 мкл/ мл 2000 родительских клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и как FR1 #14, так и родительские клетки были добавлены вместе в лунки, содержащие конъюгат или только среду. Все планшеты инкубировали в 37°C инкубаторе с 5% CO_2 в течение 4 дней. Общий объем был 150 мкл/лунку. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 75 мкл/лунку Cell Titer Glo (Promega) и позволили эффекту развиться в течение 45 мин. Люминесценцию определяли на люминометре и фон в лунках, содержащих только носитель, вычитали из всех значений. Гистограмма усредненных значений каждой обработки клеток была сделана с помощью Graph Pad Prism.

Как показано на фиг. 3, конъюгат huMOV19-14 оказывает слабый цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

Как показано на фиг. 13, конъюгат huMov19-90 оказывает сильный цитотоксический эффект на соседние антиген-негативные клетки.

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

Разведения конъюгатов добавляли в лунки 96-луночных планшетов, содержащих от 2×10^3 до 1×10^4 клеток на лунку в соответствующей ростовой среде. Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых соединений, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Чашки инкубировали в течение четырех-шести дней при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 6% CO_2. WST-8 реагент, 10% об./об. (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD) затем добавляли в лунки и планшеты инкубировали при 37°C в течение от 2 до 6 ч. Затем измеряли поглощение на планшет-ридере спектрофотометре в режиме двойной длины волны 450/650 нм и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали. Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками).

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

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

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

WST-8 реагент (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Затем измеряли поглощение на планшет-ридере спектрофотометре в режиме двойной длины волны 450/650 нм и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали.

Как показано на фиг. 5, конъюгат оказывает цитотоксический "эффект свидетеля" на соседние антиген-негативные клетки.

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

Самки мышей CB,17 SCID возрастом 6 недель были получены от Charles River Laboratories. Мышей инокулировали 1×10^7 NCI-H2110 опухолевых клеток, суспендированных в 0,1 мл 50% матригель/бессывороточной среде путем подкожной инъекции в правый бок. Когда объемы опухоли достигали примерно 100 мм^3 (7-й день после инокуляции), животные были рандомизированы в зависимости от объема опухоли на 5 групп по 6 мышей в каждой. Мыши получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь), huMOV19-80 или huMOV19-90 при 5 и 25 мкг/кг на основе концентрации huMOV19-80 или huMOV19-90 на 1 день (8-й день после инокуляции). huMOV19 является гуманизированным моноклональным антителом, селективно связывающимся с фолатным рецептором 1 (FOLR1).

Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в мм^3 выражали, используя формулу V=длина×ширина×высота×$^1/_2$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog. Ингибирование роста опухоли (T/C величина) определяли с помощью следующей формулы:

T/C (%) = Медианный объем опухоли обрабатываемых / Медианный объем опухоли контроля x 100.

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

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

Пример 27. Подготовка huML66-90.

Реакционную смесь, содержащую 2,0 мг/мл антитела huML66, антитело против EGFR (см. WO2012/058592, включенную посредством ссылки), и 3,5 мол.экв. соединения 90 (предварительно обработанного 5-кратным избытком бисульфита натрия в 90:10 ДМА:50 мМ сукцинат pH 5,5 в течение 4 ч при 25°C) в 15 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота) pH 8,5 буфер и 10% об./об. ДМА (N,N-диметилацетамид) совместного растворителя, инкубировали 4 ч при 25°C. После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 20 мМ гистидина, 50 мМ натрий хлорида, 8,5 мас./об.% сахарозы, 0,01% твина-20, 50 мкМ натрия бисульфита, pH 6,2 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение 4 ч при кт и затем в течение ночи при 4°C с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 30000 MWCO).

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

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

Способность конъюгата huML66-90 ингибировать рост клеток измеряли путем цитотоксических исследований in vitro. Клетки-мишени высевали в количестве 1-2000 клеток на лунку в 100 мкл полной среды RPMI (RPMI-1640, 10% сыворотки крови эмбрионов коров, 2 мМ глутамина, 1% пенициллина-стрептомицина, все реагенты от Invitrogen). Антитела разводили в полной среде RPMI с использованием 3-кратных серийных разведений и добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Конечная концентрация, как правило, находилась в диапазоне от 3×10^{-8} М до $4{,}6\times10^{-12}$ М. Клетки инкубировали при 37°C в увлажненном 5% CO_2-инкубаторе в течение 5-6 дней. Жизнеспособность оставшихся клеток определяли с помощью колориметрического анализа с WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US). В живых клетках WST-8 восстанавливается дегидрогеназами до оранжевого продукта формазана, который растворим в тканевой культуральной среде. Количество произведенного формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. WST-8 добавляли к 10% от конечного объема и инкубировали планшеты при 37°C в увлажненном 5% CO_2 инкубаторе в течение дополнительных 2-4 ч. Планшеты анализиро-

вали, измеряя поглощение при 450 нм (A450) на многолунковом планшет-ридере. Фоновое поглощение A450 лунок, содержащих только среду и WST-8, вычитали из всех значений. Жизнеспособность в процентах рассчитывали делением значения каждого обработанного образца на среднее значение лунок с необработанными клетками. Жизнеспособность в процентах=100×(A450 обработанного образца - A450 фона)/(A450 необработанного образца - A450 фона).

Значения жизнеспособности в процентах наносили на график в зависимости от концентрации антител в полулогарифмическом масштабе для каждой обработки. Кривые доза-ответ генерировали нелинейной регрессией и значение EC_{50} каждой кривой рассчитывали с помощью GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA).

Цитотоксическая активность in vitro.

Цитотоксичность in vitro конъюгата huML66-90 оценивали в присутствии и в отсутствие избытка неконъюгированного антитела, а также по сравнению с активностью неспецифического конъюгата huIgG-90 в EGFR-экспрессирующих клетках, а результаты типичного анализа цитотоксичности показаны на фиг. 9. Конъюгат huML66-90 привел к специфической гибели клеток Detroit-562 SCC-HN при значении EC_{50} 16 пМ. Наличие избытка неконъюгированного антитела значительно понижало активность и приводило к значению EC_{50} приблизительно 2 нМ. Аналогично, конъюгат huIgG-90 вместе с несвязывающим контрольным антителом huIgG приводил к гибели клеток со значением EC_{50} приблизительно 8 нМ.

Аналогичным образом конъюгат huML66-90 привел к специфической гибели клеток NCI-H292 НМКРЛ при значении EC_{50} 12 пМ. Наличие избытка неконъюгированного антитела значительно понижало активность и приводило к значению EC_{50} приблизительно 2 нМ. Аналогично, конъюгат huIgG-90 вместе с несвязывающим контрольным антителом huIgG приводил к гибели клеток со значением EC_{50} приблизительно 8 нМ.

Аналогично наблюдалась специфическая гибель клеток NCI-H1703.

Таблица 1

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

Пример 29. Цитотоксическая активность in vitro huMOV19-90.

100 мкл/лунку конъюгата huMOV19-90 разводили в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies) в 96-луночный планшет (Corning, плоскодонный) при исходных концентрациях от 3,5e-9 М до 3,5 e-8 М в трех экземплярах и серийно разводили в 3 раза в вышеупомянутых средах при температуре окружающей среды. KB клетки (буккальная эпителиальная опухоль), выращиваемые в EMEM (ATCC), дополненной инактивированной нагреванием 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies), промывали один раз PBS и отбирали с 0,05% трипсин-ЭДТА (Life Technogies). Другими протестированными клетками были NCI-H2110 (НМКРЛ) и T47D (эпителий молочной железы), выращиваемые в среде RPMI-1640 (Life Technologies), дополненной термоинактивированной 10% FBS (Life Technologies) и 0,1 мг/мл гентамицина (Life Technologies). Среда для T47D также была дополнена 0,2 МЕ/мл бычьего инсулина. Все клетки ресуспендировали в питательной среде (см. выше), чтобы нейтрализовать действие трипсина, и подсчитывали на гемоцитометре. 100 мкл/мл 1000 KB клеток/лунку или 2000 T47D и NCI-H2110 клеток/лунку добавляли в лунки, содержащие конъюгат или только среду, и инкубировали в 37°C инкубаторе с 5% CO_2 в течение 5 дней с и без 1 мкМ блокирующего антитела против FOLR1 (huMOV19). Общий объем составляет 200 мкл/лунку. Начальная концентрация каждого конъюгата на клетках КБ была 3,5e-9 М, а для клеток T47D и NCI-H2110 начальная концентрация каждого конъюгата была 3,5e-8 М. После инкубации жизнеспособность клеток анализировали путем добавления 20 мкл/лунку WST-8 (Dojindo) и позволили эффекту развиться в течение 2 ч. Поглощение считывали на планшет-ридере при 450 и 620 нм. Поглощение при 620 нм вычитали из поглощения при 450 нм. Фон в лунках, содержащих только носитель, дополнительно вычитают из скорректированных значений спектральной поглощательной способности, и подсчитывали в Excel фракцию выживших (SF) необработанных клеток. XY график концентрации ADC (M) по отношению к SF был создан при помощи Graph Pad Prism.

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

Таблица 2

	KB		NCI-H2110		T47D	
	-блок	+блок	-блок	+блок	-блок	+блок
IC_{50}	4e-12 M	8e-10 M	2e-11 M	1e-8 M	3e-11 M	8e-9 M

В другом эксперименте способность конъюгатов ингибировать рост клеток измеряли с использованием in vitro анализа на цитотоксичность на основе WST-8. Клетки в 96-луночных планшетах (как правило, 1×10^3 на лунку) обрабатывали конъюгатом в различных концентрациях в подходящей среде для культивирования клеток общим объемом 0,2 мл. Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых соединений, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Планшеты инкубировали в течение четырех-шести дней при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 6% CO_2. Реагент WST-8 (10% об./об.; Dojindo Molecular Technologies) затем добавляли в лунки и планшеты инкубировали при 37°C в течение от 2 до 6 ч в зависимости от клеточной линии. Затем измеряли поглощение на спектрофотометре-планшет-ридере в режиме двойной длины волны 450/650 нм и поглощение при 650 нм (неспецифическое рассеяние света клетками) вычитали. Полученные значения OD_{450} были использованы для расчета видимой уцелевшей фракции клеток с использованием GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA). Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками). Кривые доза-ответ получали с помощью нелинейной регрессии с использованием сигмовидного подбора кривой с переменным наклоном в Graph Pad Prism. IC_{50} (ингибирующая концентрация 50%) генерировалась программным обеспечением.

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

Таблица 3

Клеточная линия	IC50, нМ			
	huMOV19-90		huMOV19-107	
	Конъюгат	Конъюгат +немодифицированное антитело	Конъюгат	Конъюгат +немодифицированное антитело
Ishikawa	0,05	1,0	0,05	2,0
KB	0,005	1,0	0,005	0,8
NCI-H2110	0,1	4,0	0,1	7,0

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

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

Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в $мм^3$ выражали, используя формулу V=длина×ширина×высота×$^1/_2$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

Ингибирование роста опухоли (T/C величина) определяли с помощью следующей формулы:

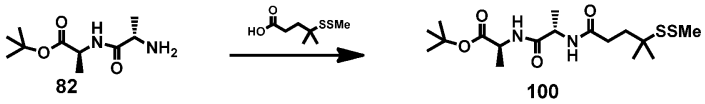
T/C (%) = Медианный объем опухоли обрабатываемых /

Медианный объем опухоли контроля x 100.

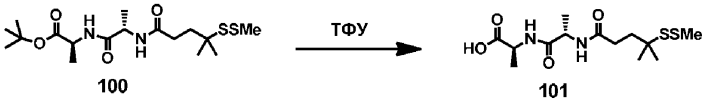
Объем опухоли определяли одновременно для обработанных (T) и контрольных (C) групп, когда объем опухоли контроля достиг заданного размера 1000 $мм^3$. Суточный средний объем опухоли каждой обработанной группы определяли в том числе у мышей без опухолей (0 $мм^3$). В соответствии со стандартами NCI T/C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

Как показано на фиг. 14, конъюгат huMOV19-90 активен в дозе 3 мкг/кг и высокоактивен в дозе 5 мкг/кг.

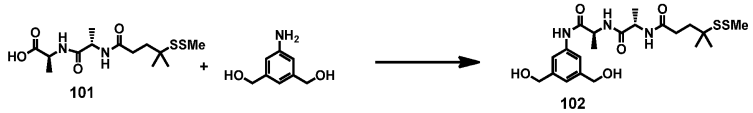
Пример 31. Синтез соединения 107



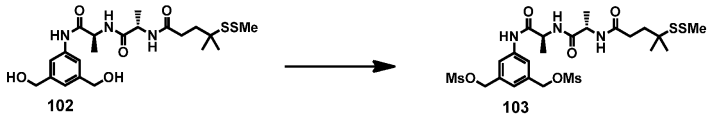
Стадия 1. Соединение 82 (500 мг, 2,31 ммоль), 4-метил-4-(метилдисульфонил)пентановой кислоты (449 мг, 2,31 ммоль), ЭДК·HCl (465 мг, 2,43 ммоль), ГОБт (354 мг, 2,31 ммоль) и ДИПЭА (0,81 мл, 4,62 ммоль) растворяли в ДМФ (7,7 мл) и перемешивали на протяжении ночи, пока реакция не закончится. Реакционную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



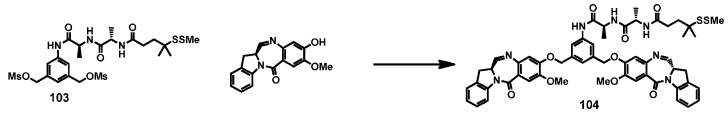
Стадия 2. ТФУ (2,6 мл) и воду (0,17 мл) добавляли к неразбавленному соединению 100 (875 мг, 2,23 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре до окончания реакции. Реакционную смесь разбавляли и подвергали азеотропной перегонке с ацетонитрилом с получением липкого масла. Затем его разбавили ацетонитрилом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



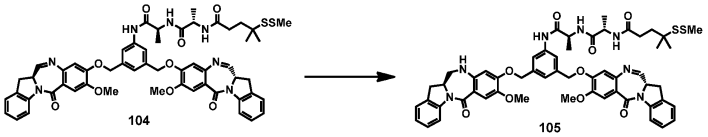
Стадия 3. Соединение 101 (923 мг, 1,65 ммоль) и (5-амино-1,3-фенилен)диметанол (240 мг, 1,57 ммоль) растворяли в ДМФ (5,2 мл). ЭДК·HCl (601 мг, 3,13 ммоль) и ДМАП (96 мг, 0,78 ммоль) добавляли при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом и промывали водой три раза. Органический слой сушили, концентрировали в вакууме и очищали хроматографией на силикагеле (ДХМ/MeOH), чтобы получить соединение 102 (150 мг, 20% выход). ЖХМС=3,91 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 472,2 $(M+1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, MeOD): δ 9,69 (с, 1H), 8,21 (д, 1H, J=6,8 Гц), 8,18 (д, 1H, J=6,8 Гц), 7,52 (с, 2H), 7,12 (с, 1H), 4,58 (с, 4H), 4,44-4,48 (м, 1H), 4,29-4,32 (м, 1H), 3,34 (с, 2H), 2,38 (с, 3H), 2,34-2,40 (м, 2H), 1,90-1,95 (м, 2H), 1,43 (д, 3H, J=7,2 Гц), 1,36 (д, 3H, J=7,2 Гц), 1,30 (с, 6H).



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

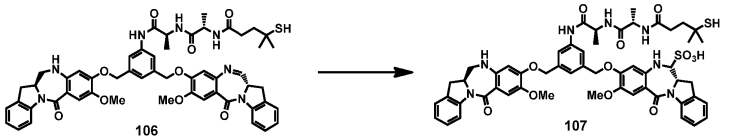


Стадия 5. Соединение 103 готовили так же, как и соединение 57 в примере 7. Сырое твердое вещество содержало соединение 104 (203 мг, 44% выход, 60% чистота), которое использовали без дополнительной очистки. ЖХМС=5,68 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1024,3 $(M+1)^+$.



Стадия 6. Соединение 104 готовили так же, как и соединение 12 в примере 1. Неочищенный остаток очищали ОФВЭЖХ (C18 колонка, CH_3CN/H_2O, градиент, 50-65%), чтобы получить моноиминное соединение 105 в виде твердого вещества (22 мг, 16% выход, 90% чистота). ЖХМС=6,00 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1027,3 $(M+1)^+$.

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



Стадия 8. Соединение 106 (21 мг, 0,021 ммоль) суспендировали в 2-пропаноле (1428 мкл) и воде (714 мкл). Добавляли метабисульфит натрия (22,30 мг, 0,214 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Реакционную смесь разбавляли смесью ацетонитрил/вода, замораживали и лиофилизировали. Полученный белый порошок очищали ОФВЭЖХ (С18 колонка, CH_3CN/H_2O, градиент, 20-40%) и необходимые фракции собирали и лиофилизировали, чтобы получить соединение 107 (5,3 мг, 23% выход). ЖХМС=5,67 мин (8-минутный метод). МС (m/z): 1060,2 $(M-1)^-$.

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

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

После реакции конъюгат очищали, и буфер заменили на буферную композицию с 10 мМ Трис, 80 мМ NaCl, 50 мкМ бисульфита, 3,5% сахарозы, 0,01% твина-20, pH 7,6 с использованием колонок обессоливания NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Диализ проводили в том же буфере в течение ночи при 4°С с использованием диализных кассет Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 10000 MWCO).

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

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

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

Размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в $мм^3$ выражали, используя формулу V=длина×ширина×высота×$^1/_2$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

Ингибирование роста опухоли (T/C величина) определяли с помощью следующей формулы:

T/C (%) = Медианный объем опухоли обрабатываемых /

Медианный объем опухоли контроля x 100.

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

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

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

Самки мышей CD-1 возрастом 7 недель были получены от Charles River Laboratories. Мыши получали однократное внутривенное введение конъюгата huMov19-90 в форме одинарной внутривенной болюсной инъекции в боковую хвостовую вену. Каждая мышь получила дозу в 2,5 мг/кг из расчета на Ab. Доза и вводимый объем были индивидуализированы на основе массы тела каждой мыши. Инъекции проводили с помощью шприца объемом 1,0 мл, снабженным иглой 27 калибра, длиной $^1/_2$ дюйма. В 2 ч и 30 мин, через 2, 4 и 8 ч, а также через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 и 28 дней после введения конъюгата huMov19-90 мышей анестезировали путем ингаляции изофлураном и отбирали примерно 150 мкл крови из правого ретроорбитального кровяного синуса в гепаринизированную капиллярную трубку. В каждый момент времени (от 0 до 21 дней) кровь отбирали у всех трех мышей в одной группе. Группы сдавали кровь по очереди; так что у мышей в партии не брали образцы крови более чем два раза в течение 24-часового периода. В конечной точке времени, через 28 дней после введения пробы брали у всех мышей. Образцы крови центрифугировали для отделения плазмы. 30 мкл плазмы переносили в отдельные помеченные микропробирки для каждого образца и момента времени, а затем хранили замороженными при -80°C, чтобы сделать возможным их последующий анализ методом ELISA для определения концентраций общего Ab (как неконъюгированного Ab, так и неповрежденного конъюгата) и неповрежденного конъюгата с использованием антитела против индолинобензодиазепина.

Как показано на фиг. 18, конъюгат huMov19-90 обладает клиренсом, аналогичным клиренсу антитела.

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

Клетки KB, экспрессирующие фолатный рецептор фолата α (FRα), культивировали на 5×T150 планшетах для тканевых культур. Насыщающее количество нацеленного на FRα конъюгата huMov19-90 инкубировали с клетками KB в течение 24 ч при 37°C в увлажненном инкубаторе, забуференном 5% CO_2. Через 24 ч среду, содержащую оттекающие от клеток катаболиты, собирали и объединяли для следующего анализа.

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

Анализ МС.

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

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

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

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

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

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

Мыши в эксперименте с ксенотрансплантатом Ishikawa получали однократное внутривенное введение носителя-контроля (0,2 мл/мышь) или huMov19-90 в дозах 10 или 30 мкг/кг или нетаргетного кон-

трольного конъюгата chKTI-90 в дозе 30 мкг/кг на основе концентрации лекарства на 1 день (18-й день после инокуляции).

Во всех экспериментах размер опухоли измеряли от двух до трех раз в неделю в трех измерениях с использованием штангенциркуля. Объем опухоли в $мм^3$ выражали, используя формулу V=длина×ширина×высота×$^1/_2$. Считали, что у мыши частичная регрессия (PR), когда объем опухоли был уменьшен на 50% или более, и полная регрессия опухоли (CR), когда нельзя было выявить ощутимую опухоль. Объем опухоли определяли с помощью программного обеспечения StudyLog.

Ингибирование роста опухоли (T/C величина) определяли с помощью следующей формулы:

T/C (%) = Медианный объем опухоли обрабатываемых / Медианный объем опухоли контроля x 100.

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

Как показано на фиг. 22, конъюгат huMov19-90 был неактивен в ксенотрансплантатной модели NCI-H2110 в дозе 1 мкг/кг, активен в дозе 3 мкг/кг с T/C 13% и 1/6 PR и высокоактивен в дозе 5 мкг/кг с T/C 2%, 6/6 PR и 4/6 CR.

Как показано на фиг. 23, конъюгат huMov19-90 был активен в ксенотрансплантатной модели Hec-1b в дозе 10 мкг/кг с T/C 15% и 1/6 PR и высокоактивен в дозе 30 мкг/кг с T/C 9%, 6/6 PR и 6/6 CR. Нетаргетный контрольный конъюгат chKTI-90 был активен в дозе 30 мкг/кг с T/C 34%.

Как показано на фиг. 24, конъюгат huMov19-90 был активен в ксенотрансплантатной модели Ishikawa в дозе 10 мкг/кг с T/C 27%, 6/6 PR и 6/6 CR и активен в дозе 30 мкг/кг с T/C 15%, 6/6 PR и 6/6 CR. Нетаргетный контрольный конъюгат chKTI-90 был активен в дозе 30 мкг/кг с T/C 24% и 4/6 PR.

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

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

Пример 38. Аффинность конъюгата CD123-90.

Аффинность связывания ADC конъюгата примерного гуманизированного антитела против CD123 антитела, huCD123-6Gv4,7S3 антитела, анализировали и сравнивали с соответствующим неконъюгированным антителом с помощью проточной цитометрии с использованием клеток HNT-34. Клетки HNT-34 ($5×10^4$ клеток на образец) инкубировали с различными концентрациями ADC и неконъюгированного huCD123-6Gv4,7S3 антитела в 200 мкл буфера FACS (DMEM среды с добавлением 2% нормальной козьей сыворотки). Затем клетки осаждали, промывали дважды и инкубировали в течение 1 ч со 100 мкл фикоэритрин(ФЭ)-сконъюгированного козьего антитела против человеческого IgG (Jackson Laboratory). Клетки осаждали снова, промывали буфером FACS и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1% формальдегида. Образцы были получены с использованием проточного цитометра FACSCalibur с многолунковым пробоотборником HTS или проточного цитометра массивов FACS и проанализированы с помощью CellQuest Pro (все от BD Biosciences, San Diego, США). Для каждого образца было рассчитано геометрическое среднее интенсивности флуоресценции для FL2 и отложено на графике в зависимости от концентрации антител в полулогарифмическом масштабе. Кривую доза-ответ генерировали нелинейной регрессией и значение EC_{50} каждой кривой, соответствующее явной константе диссоциации (Kd) каждого антитела, рассчитывали с использованием GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA).

Как показано на фиг. 26, конъюгация влияла на аффинность примерного антитела против CD123 только умеренно.

Пример 39. Цитотоксическая активность in vitro huCD123-90.

Способность конъюгатов антитело-лекарственное средство (АЛК) huCD123-6, антитела против CD123, убивать клетки, которые экспрессируют CD123 на поверхности, измеряли с использованием анализов цитотоксичности in vitro. Клеточные линии культивировали в культуральной среде в соответствии с рекомендациями поставщика клеток (ATCC или DSMZ). Клетки в количестве от 2000 до 10000 в 100 мкл культуральной среды добавляли в каждую лунку плоскодонных 96-луночных планшетов. Чтобы блокировать Fc рецепторы на поверхности клетки, культуральную среду дополняли 100 нМ антитела chKTI (антитела того же изотипа). Конъюгаты разводили в культуральной среде с использованием 3-кратных серийных разведений и добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Дабы определить вклад CD123-независимой цитотоксичности, в некоторые лунки перед конъюгатами добавляли CD123 блок (например, 100 нМ антитела chCD123-6). Контрольные лунки, содержащие клетки и среду, но не содержащие тестируемых конъюгатов, а также лунки, содержащие только среду, включали в каждый планшет для анализа. Эксперименты были проведены в трех повторах для каждой точки данных. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажненном 6% CO_2 инкубаторе в течение 4-7 дней. Затем определяли относительное количест-

во жизнеспособных клеток в каждой лунке с помощью Cell Counting Kit-8 на основе WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD). Видимую часть выживших клеток в каждую лунку рассчитывали путем первой корректировки для среднего фонового поглощения и последующим делением каждого значения на среднее значение в контрольных лунках (с необработанными клетками). Фракцию выживших клеток наносили на график в зависимости от концентрации конъюгата в полулогарифмическом масштабе.

В исследовании использовали 15 CD123-положительных клеточных линий различного происхождения (ОМЛ, В-ОЛЛ, ХМЛ и НХЛ) (табл. 4). Большинство клеточных линий были получены от пациентов-носителей злокачественности по крайней мере с одним отрицательным прогностическим фактором (например, повышенная экспрессия Р-гликопротеина, повышенная экспрессия EVI1, изменения p53, мутации DNMT3A, внутренняя тандемная дупликация FLT3). Конъюгаты продемонстрировали высокую активность на этих клеточных линиях со значениями IC_{50} от суб-пМ до низких нМ (табл. 4).

Таблица 4

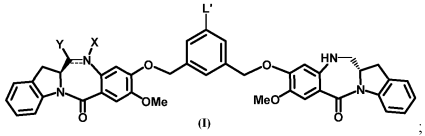
In vitro цитотоксичность конъюгата huCD123-6-90 против CD123-положительных клеточных линий различного происхождения

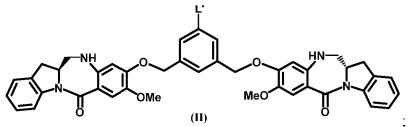
Клеточная линия	Происхождение	Отрицательный прогностический фактор	IC_{50} (М)
THP1	ОМЛ	делеция p53	6,7E-12
SHI-1	ОМЛ	изменения в гене p53	1,3E-11
KO52	ОМЛ	мутантный p53, сверхэкспрессия Pgp	1,4E-11
KASUMI-3	ОМЛ	сверхэкспрессия EVI1 и Pgp	9,8E-12
KG-1	ОМЛ	мутантный p53, сверхэкспрессия Pgp	2,2E-10
OCI-AML2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

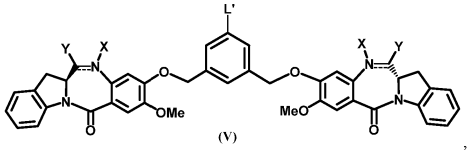
Все публикации, патенты, патентные заявки, Интернет-сайты и учетные номера/последовательности в базах данных (в том числе полинуклеотидные и полипептидные последовательности), цитируемые здесь, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей, в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента, патентной заявки, Интернет-сайта или учетного номера/последовательности в базе данных было конкретно и отдельно указано, что она таким образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Цитотоксическое соединение, представленное любой из следующих формул:


(I);


(II);


(V),

или его фармацевтически приемлемая соль,

где L' представлен одной из следующих формул:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J$ (B1);

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J$ (B2);

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s$ (B3);

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-J$ (C1);

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J$ (C2); и

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^s$ (C3);

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

J представляет собой -COOH, -COOMe или группу реакционноспособного сложного эфира, выбранную из N-гидроксисукцинимидного сложного эфира, N-гидроксисульфосукцинимидного сложного эфира, нитрофенильного сложного эфира, динитрофенильного сложного эфира, сульфотетрафторфенильного сложного эфира и пентафторфенильного сложного эфира;

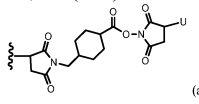
R_a и R_b, каждый независимо, представляют собой -H, (C_1-C_3)алкил или $-SO_3H$;

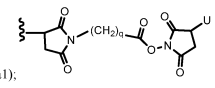
m равен целому числу от 1 до 6;

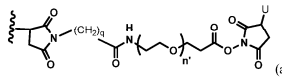
m' равен 0 или целому числу от 1 до 6 и

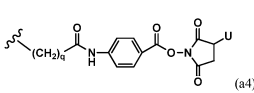
Cy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом;

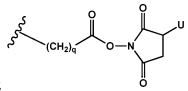
Z^s представляет собой -H, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ или выбран из любой из следующих формул:

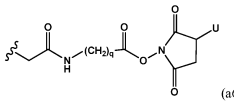

(a1);

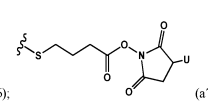

(a2);

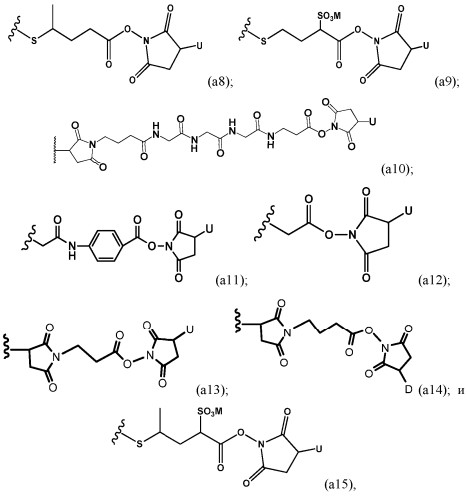

(a3);


(a4);


(a5);


(a6);


(a7);



(a8); (a9); (a10); (a11); (a12); (a13); (a14); и (a15),

где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой -H или SO_3M;

M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;

R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила, динитрофенила, карбоксинитрофенила, пиридила или нитропиридила;

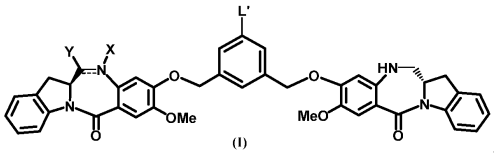
R^{d1} представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода;

двойная линия ⚌ между N и C символизирует одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой H, а если это одинарная связь, то X представляет собой H, Y представляет собой -OH или SO_3M;

R_5 независимо представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что соединение представлено следующей формулой:



(I),

или его фармацевтически приемлемой солью.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что L' представлен следующей формулой:

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (B1);$$

$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (B2);$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}J \quad (C1), \text{ или}$$

$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}Cy\text{-}(CR_aR_b)_{m'}\text{-}J \quad (C2).$$

4. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что L' представлен следующей формулой:

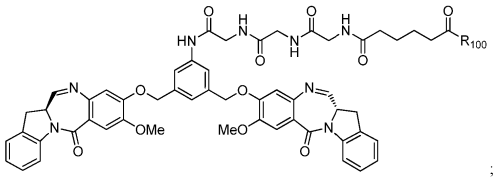
$$-NR_5\text{-}P\text{-}C(=O)\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (B3); \text{ или}$$

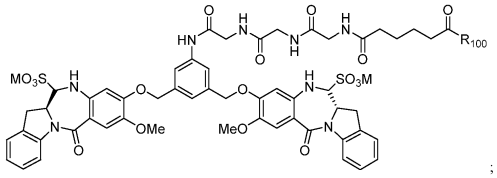
$$-C(=O)\text{-}P\text{-}NR_5\text{-}(CR_aR_b)_m\text{-}S\text{-}Z^s \quad (C3).$$

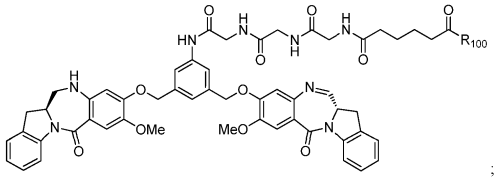
5. Соединение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков.

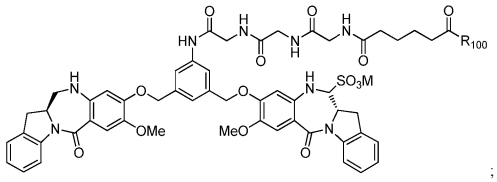
6. Соединение по п.5, отличающееся тем, что P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu и Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala.

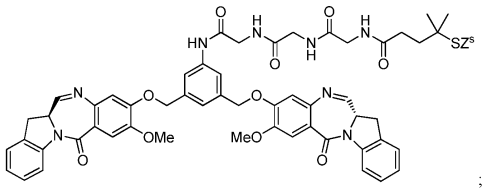
7. Соединение по п.1, отличающееся тем, что соединение выбрано из любой из следующих формул:

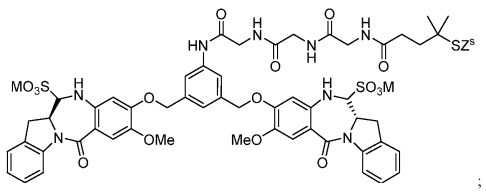

;

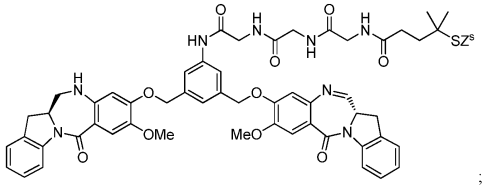

;

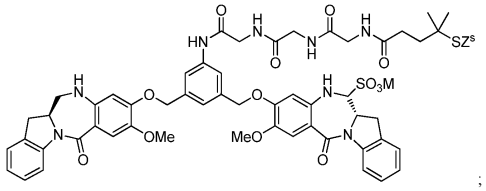

;

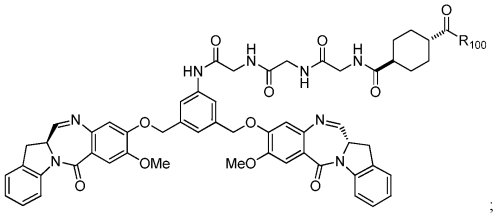

;

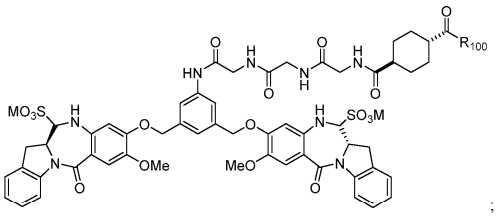

;

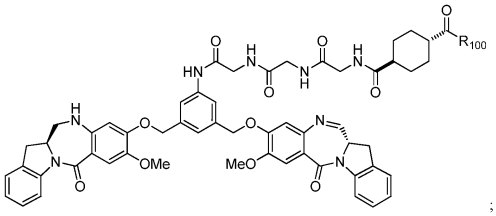

;

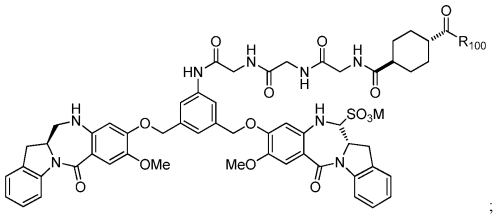

;

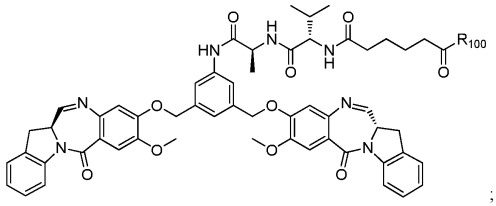

;

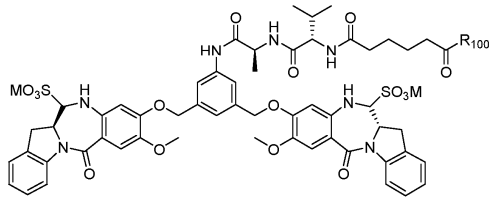

;

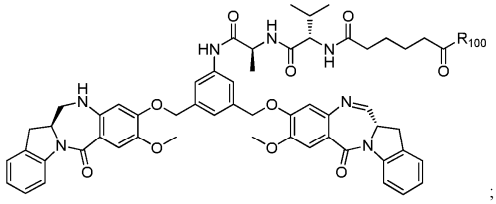

;

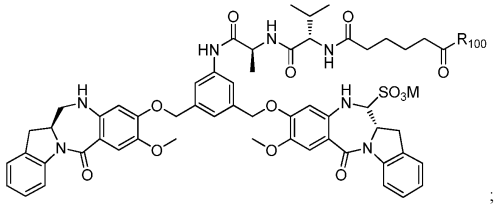

;

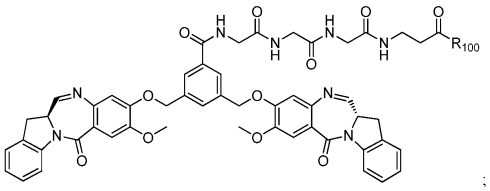

;
;

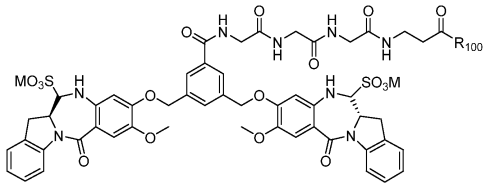

;

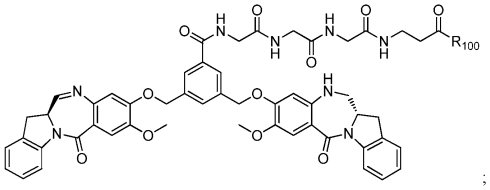

;

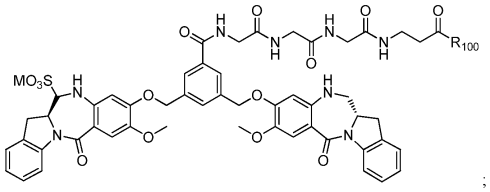

;

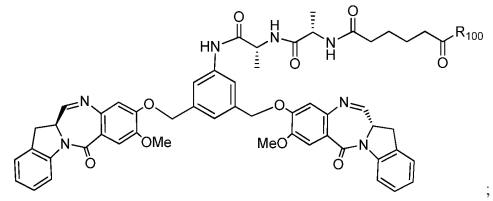

;

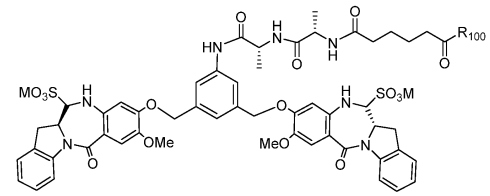

;

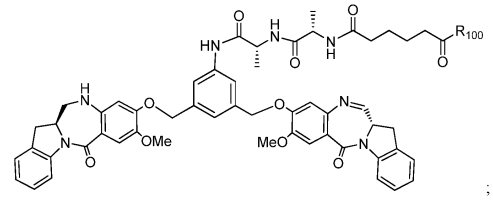

;

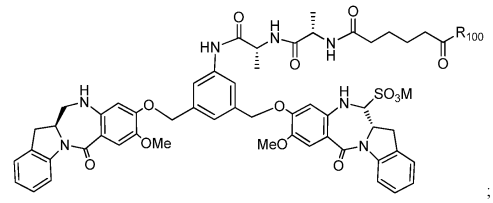

;

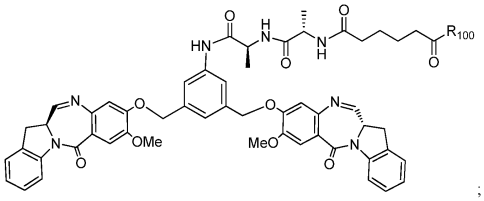

;

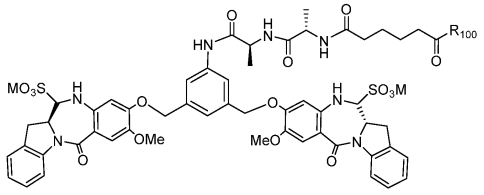

;

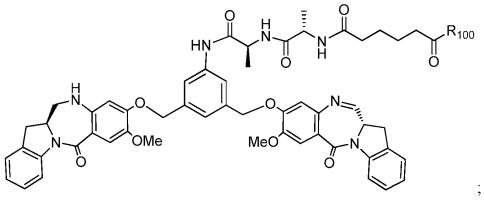

;

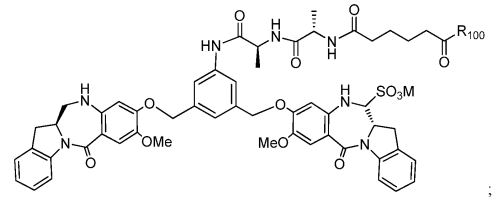

;

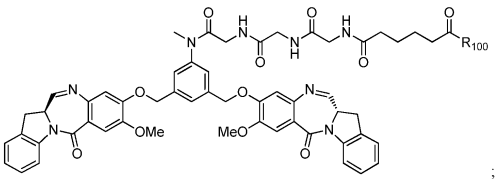

;

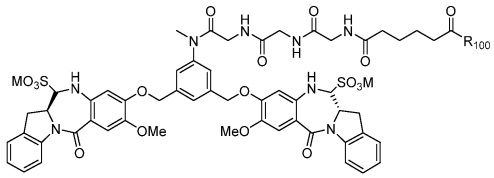

;

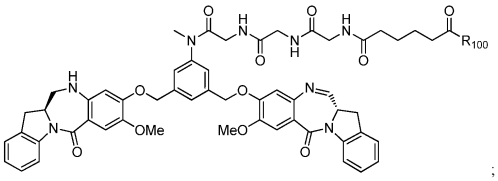

;

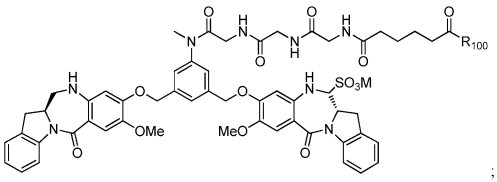

;

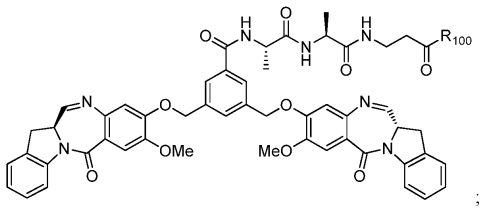

;

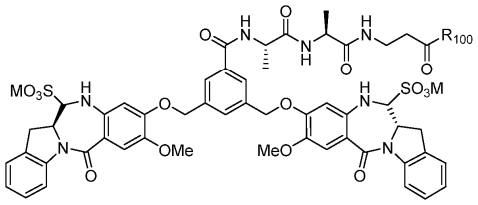

;

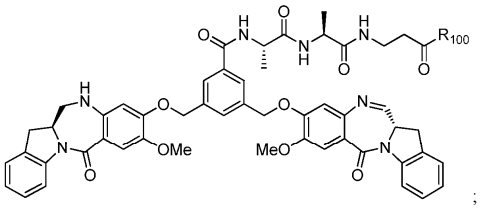

;

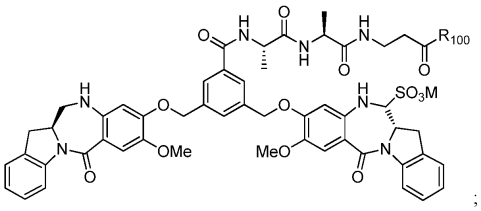

;

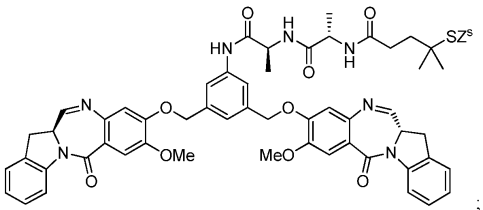

;

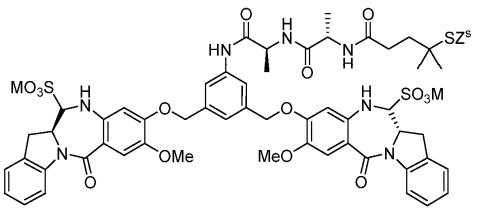

;

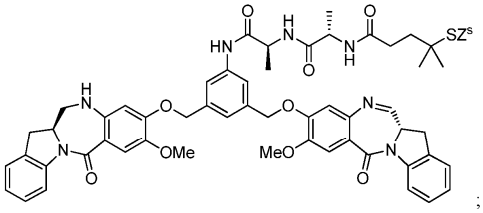

;

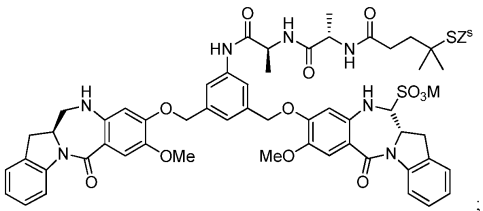

;


;


;

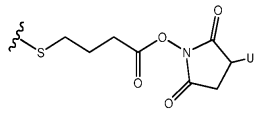

;


;

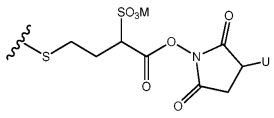

;

или их фармацевтически приемлемых солей,

где R_{100} представляет собой -OH, -OMe или ;
M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;
Z^s представляет собой -H, $-SR^d$ или выбран из любой из следующих формул:



(a7); и

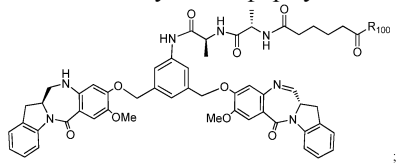


(a9);

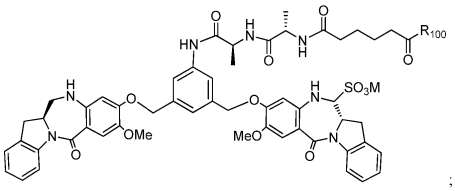
где U представляет собой -H или SO_3M и

R^d представляет собой линейный или разветвленный алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, или выбран из фенила, нитрофенила, карбоксинитрофенила, пиридила и нитропиридила.

8. Соединение, выбранное из одной из следующих формул:



; и



;

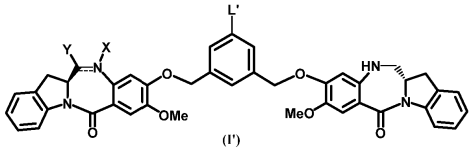
или его фармацевтически приемлемая соль,

где R_{100} представляет собой -OH, -OMe или ;

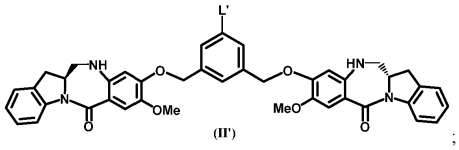
U представляет собой -H или SO_3M и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

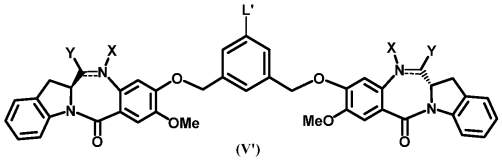
9. Конъюгат, включающий цитотоксическое соединение и связывающийся с клетками агент (СКА), при этом цитотоксическое соединение ковалентно связано с СКА, где СКА представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с целевой клеткой, и указанное цитотоксическое соединение представлено одной из следующих формул:



(I')



(II');



(V'),

или их фармацевтически приемлемых солей,

где L' представлен одной из следующих формул:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (B2');

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (C1');

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (C2');

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (B3'); и

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (C3');

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

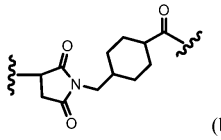
R_a и R_b, каждый независимо, представляют собой -H, (C_1-C_3)алкил или -SO_3H;

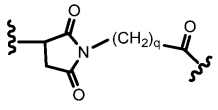
m равен целому числу от 1 до 6;

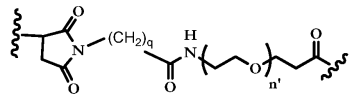
m' равен 0 или целому числу от 1 до 6 и

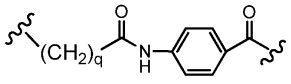
Cy представляет собой циклический алкил, имеющий от 5 до 6 кольцевых атомов углерода, необязательно замещенный галогеном, -OH, (C_1-C_3)алкилом, (C_1-C_3)алкоксигруппой или гало(C_1-C_3)алкилом;

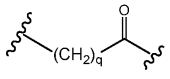
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:

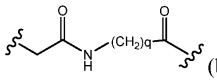

(b1);

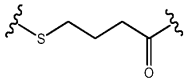

(b2);

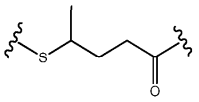

(b3);

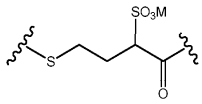

(b4);

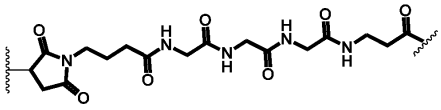

(b5);

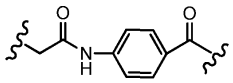

(b6);

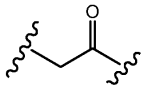

(b7);

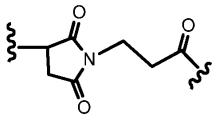

(b8);

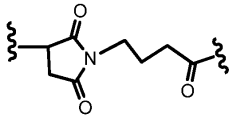

(b9);

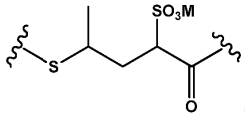

(b10);


(b11);


(b12);


(b13);


(b14); и


(b15),

где q равен целому числу от 1 до 5;

n' равен целому числу от 2 до 6;

U представляет собой H или SO_3M и

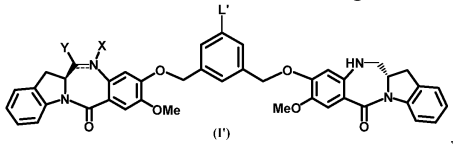
M представляет собой H^+, Na^+ или K^+;

двойная линия ⚌ между N и C представляет одинарную связь или двойную связь при условии, что если это двойная связь, то X отсутствует и Y представляет собой H, а если это одинарная связь, то X представляет собой H, Y представляет собой -OH или SO_3M;

R_5 независимо представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил и

M представляет собой H, Na^+ или K^+.

10. Конъюгат по п.9, отличающийся тем, что соединение представлено следующей формулой:


(I'),

или его фармацевтически приемлемой солью.

11. Конъюгат по п.9 или 10, отличающийся тем, что L' представлен следующей формулой:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1');

$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (B2');

$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (C1'), или

$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-C(=O)-$ (C2').

12. Конъюгат по п.9 или 10, отличающийся тем, что L' представлен следующей формулой:

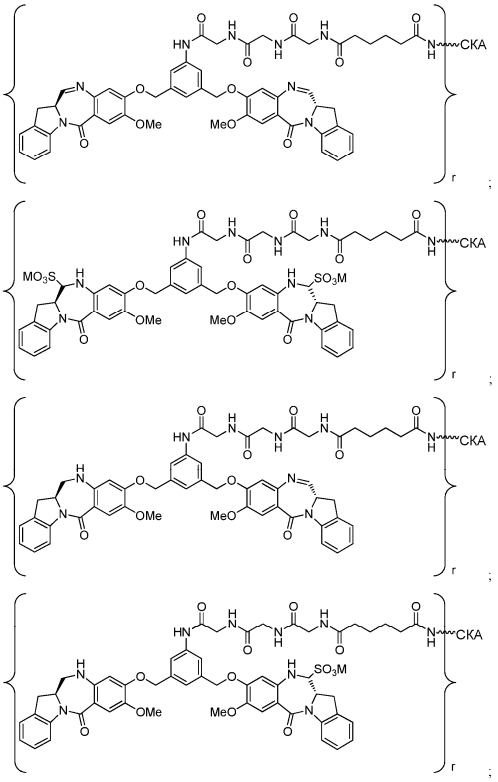
$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (B3'); или

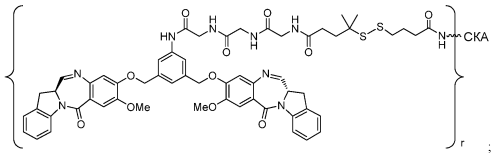
$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}$ (C3').

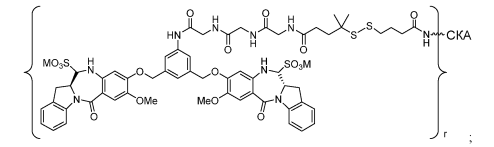
13. Конъюгат по любому из пп.9-12, отличающийся тем, что P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков.

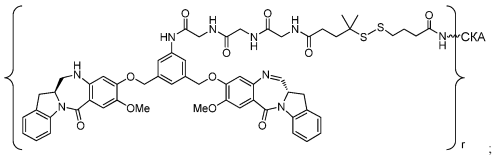
14. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met и Met-Ala.

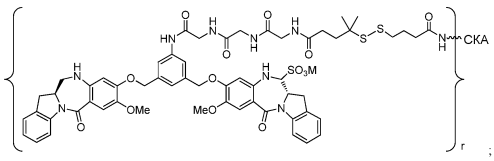
15. Конъюгат по п.10, отличающийся тем, что конъюгат выбран из любой из следующих формул:

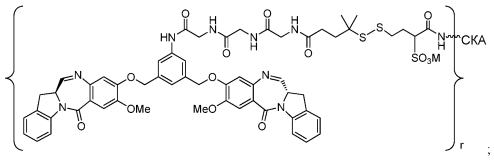


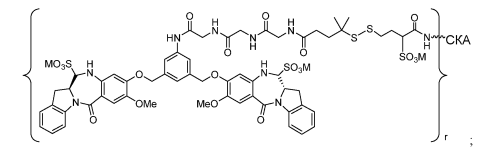


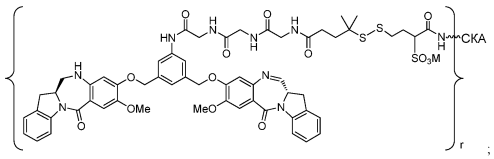


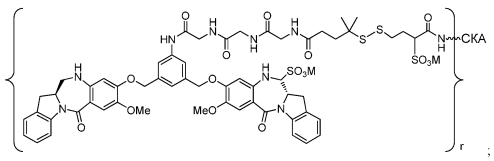


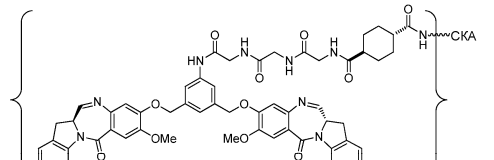


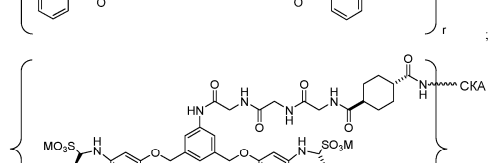


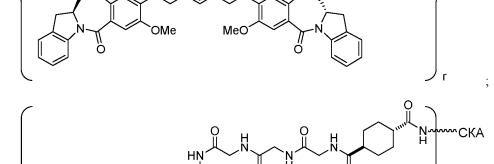


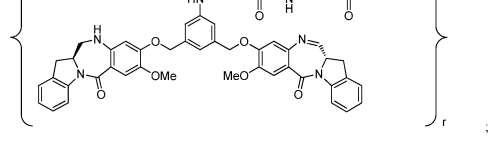


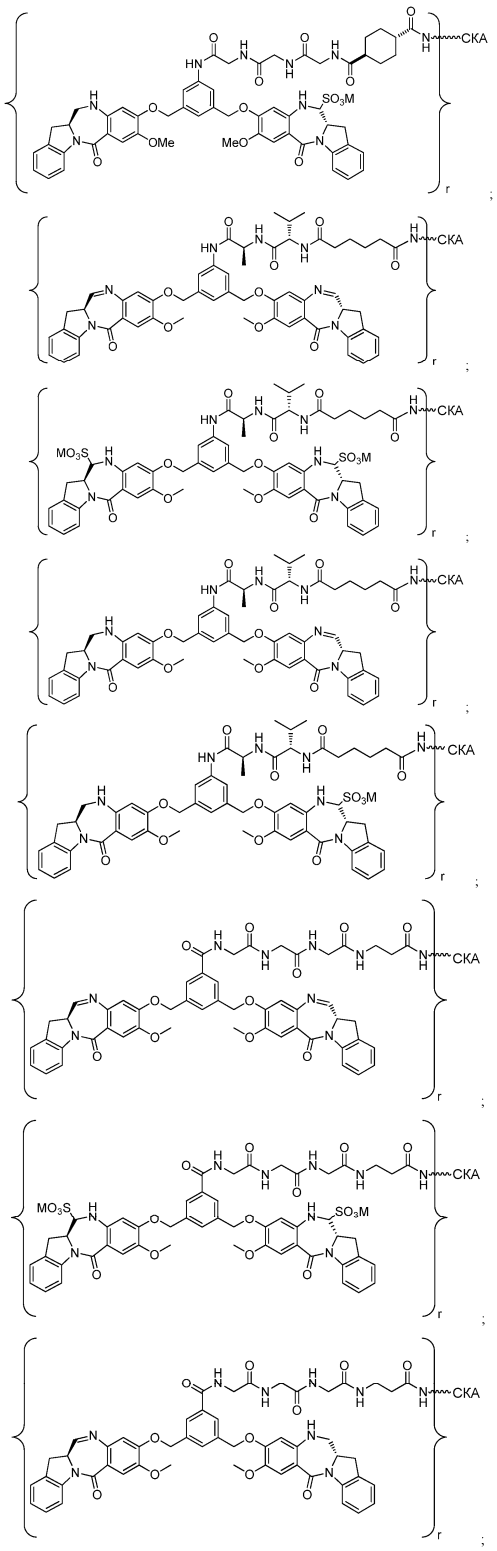


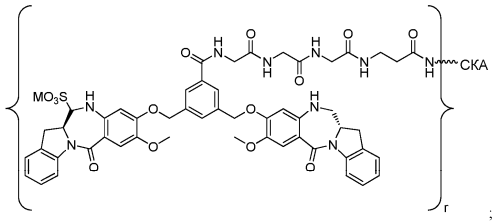


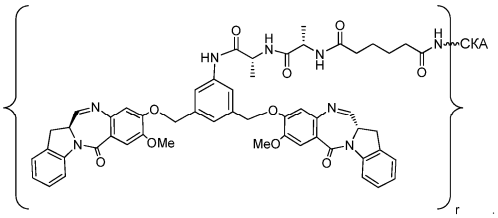


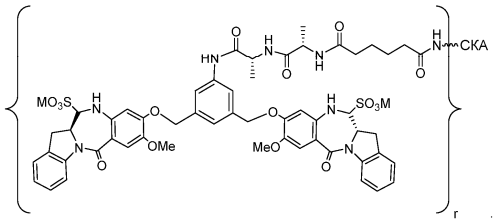


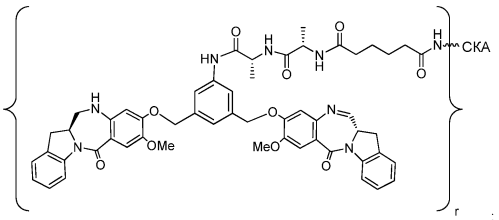


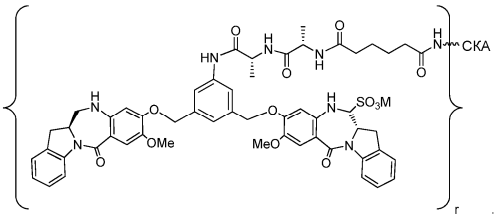


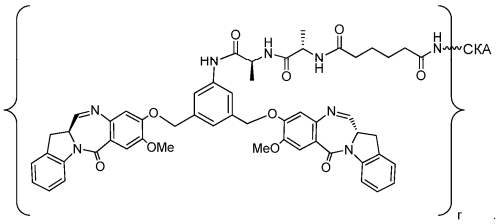


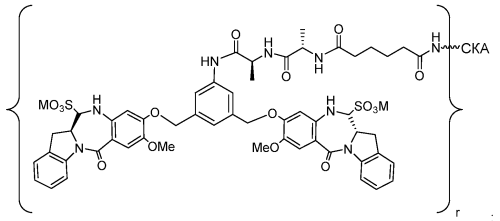




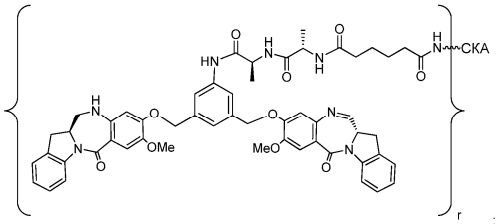




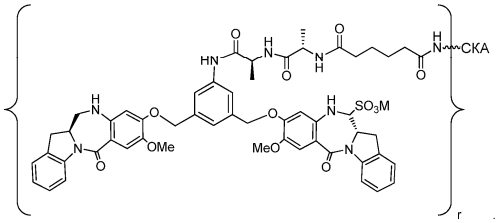




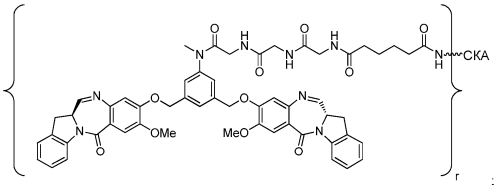
;



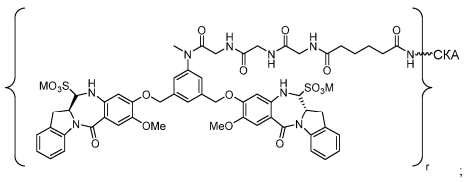
;



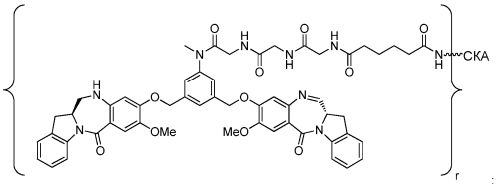
;



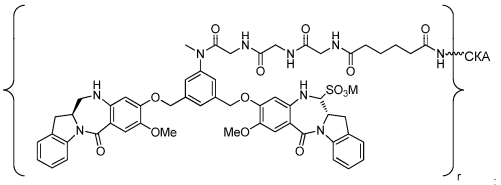
;



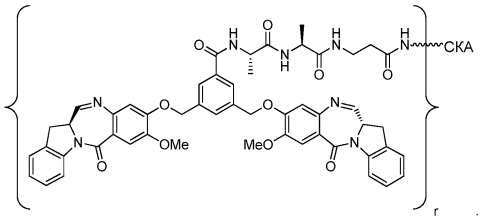
;

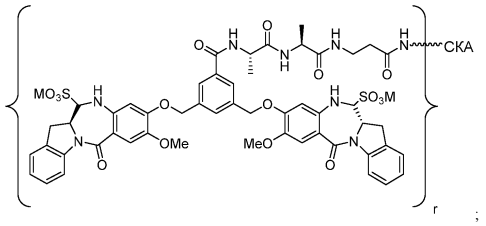


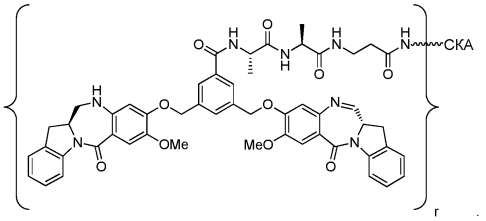
;

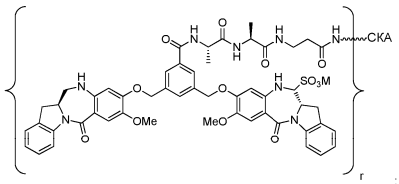


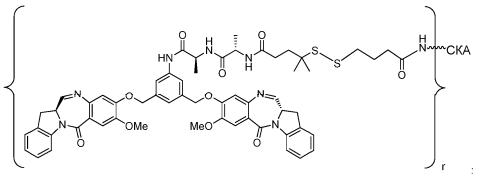
;

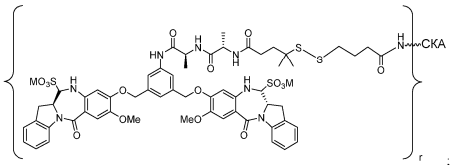

CKA
OMe
MeO
r

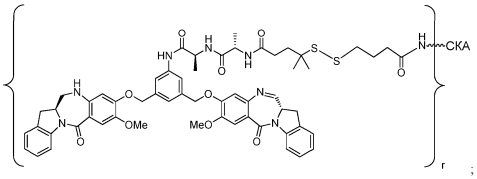

CKA
MO3S
SO3M
OMe
MeO
r

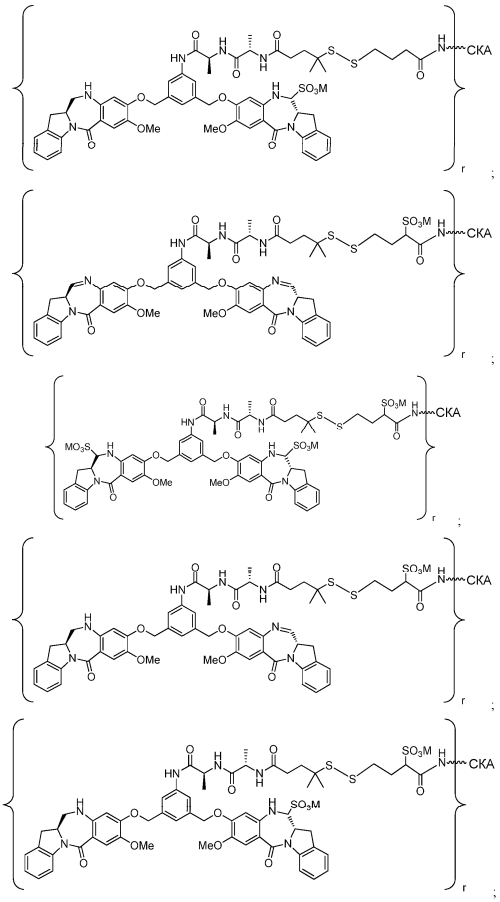

CKA
OMe
MeO
r


CKA
SO3M
OMe
MeO
r


CKA
OMe
MeO
r

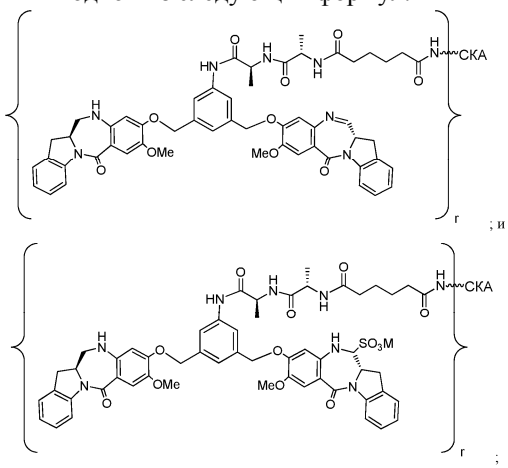

CKA
MO3S
SO3M
OMe
MeO
r


CKA
OMe
MeO
r



или их фармацевтически приемлемых солей,
где r равен целому числу от 1 до 10 и
M представляет собой H^+, Na^+ или K^+.

16. Конъюгат, представленный одной из следующих формул:



или его фармацевтически приемлемая соль,
где СКА представляет собой антитело;
r представляет собой целое число от 1 до 10 и
M представляет собой H^+, Na^+ или K^+.

17. Конъюгат по любому из пп.9-16, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела является одноцепочечным антителом, моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом моноклонального антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, химерным антителом, фрагментом химерного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой, доменным антителом или фрагментом доменного антитела, который специфично связывается с целевой клеткой.

18. Конъюгат по любому из пп.9-16, отличающийся тем, что антитело выбирается из группы, состоящей из антитела против фолатного рецептора или фрагмента такого антитела, антитела против EGFR или фрагмента такого антитела, антитела против CD33 или фрагмента такого антитела, антитела против

CD19 или фрагмента такого антитела, антитела против Muc1 или фрагмента такого антитела и антитела против CD37 или фрагмента такого антитела.

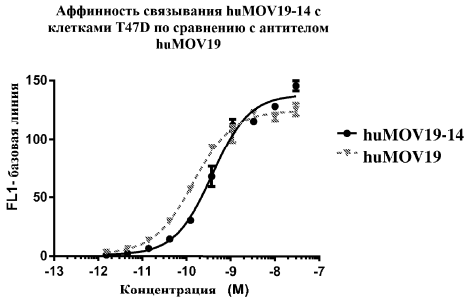
19. Конъюгат по п.17 или 18, отличающийся тем, что антитело является (a) антителом с измененной поверхностью, одноцепочечным антителом с измененной поверхностью или фрагментом упомянутых антител с измененной поверхностью, (b) моноклональным антителом, одноцепочечным моноклональным антителом или фрагментом упомянутых моноклональных антител или (c) гуманизированным антителом, одноцепочечным гуманизированным антителом или фрагментом гуманизированного антитела.

20. Фармацевтическая композиция для лечения рака у млекопитающего, содержащая конъюгат по любому из пп.9-19 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения рака у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-8 или конъюгата по любому из пп.9-19.

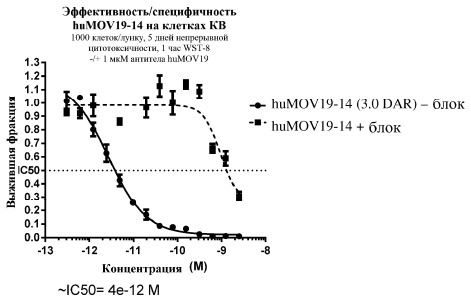
22. Способ по п.21, в котором рак представляет собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, меланому, рак легкого, рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак простаты, эндометриальный рак, лимфому, миелодиспластический синдром (МДС), перитонеальный рак или лейкоз.

23. Способ по п.22, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому или миелодиспластический синдром, а лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый моноцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, эозинофильный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ).



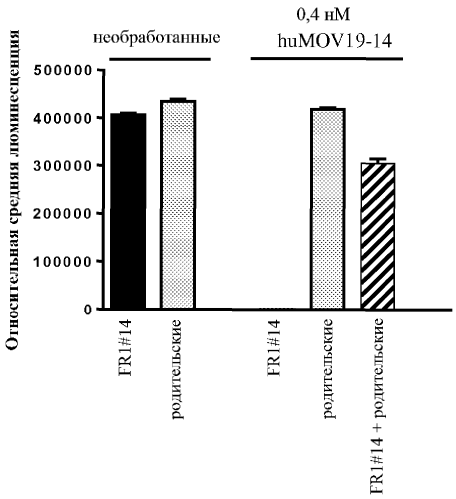
	huMOV19-14	huMOV19
EC50	3,793e-010	1,438e-010

Фиг. 1

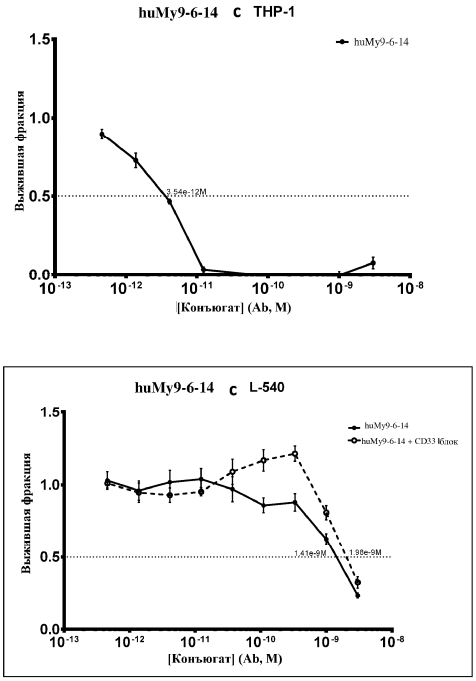


Фиг. 2

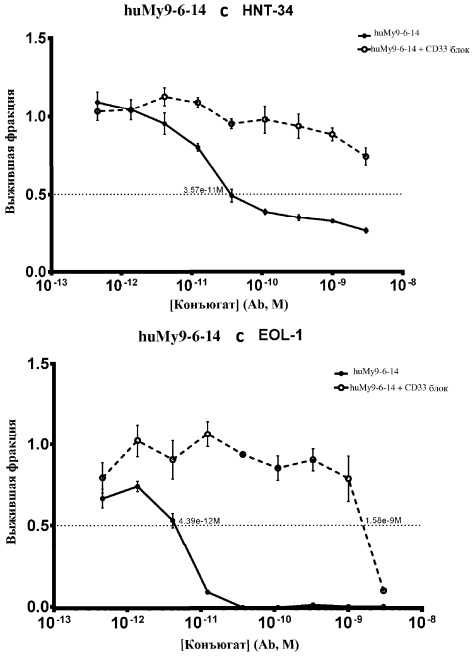
huMOV19-14



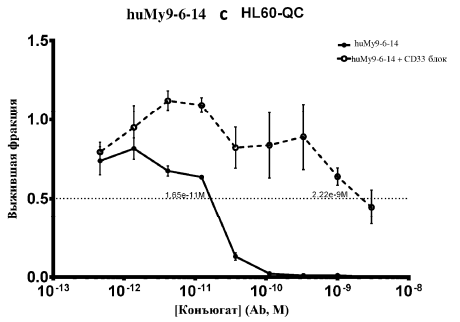
Фиг. 3



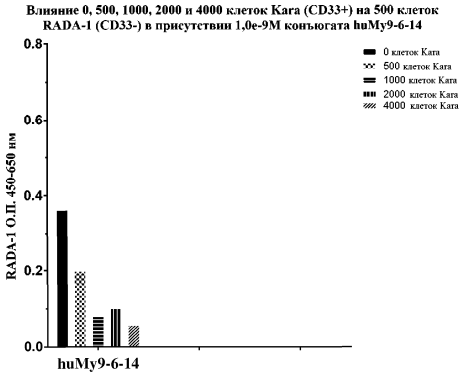
Фиг. 4А



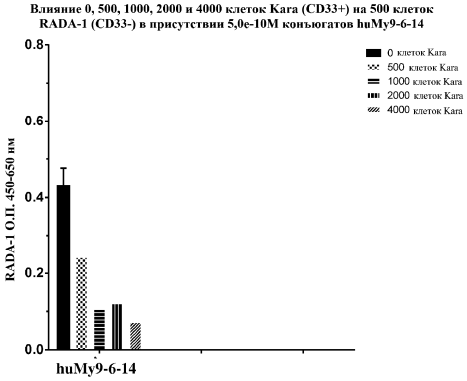
Фиг. 4B



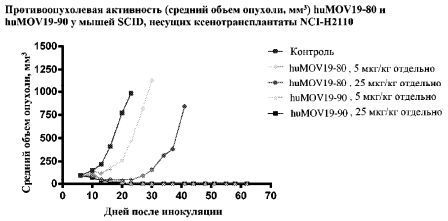
Фиг. 4C



Фиг. 5A

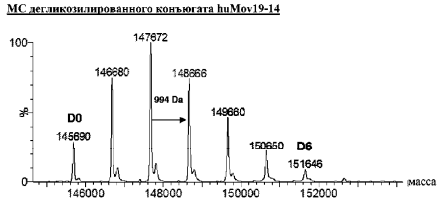


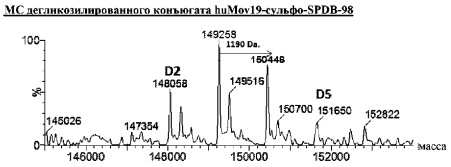
Фиг. 5B

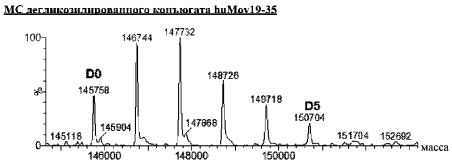


Группа лечения		Доза (мкг/кг)	T/C (День 23)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Контроль	-	-	-	-	-
B	huMOV19-80	5	47%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMOV19-80	25	5%	5/6	1/6	Высокоактивен
D	huMOV19-90	5	0%	6/6	6/6	Высокоактивен
E	huMOV19-90	25	0%	6/6	6/6	Высокоактивен

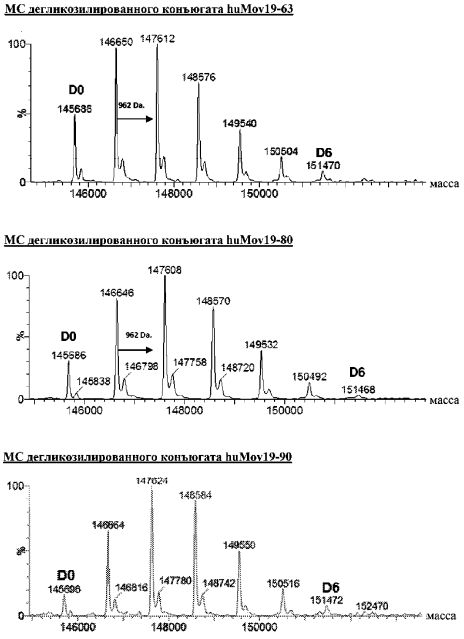
Фиг. 6



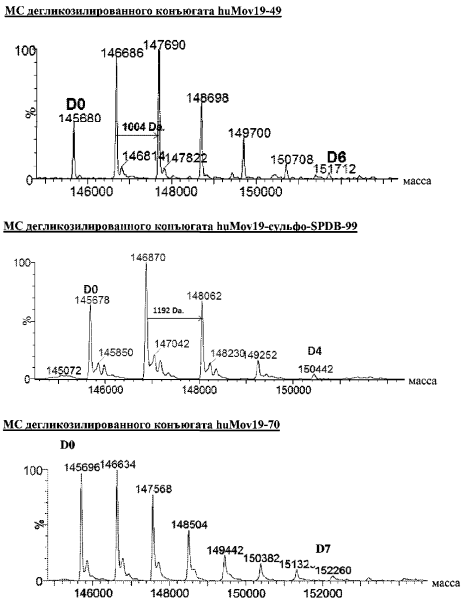




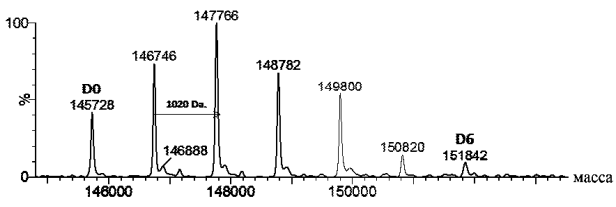
Фиг. 7A



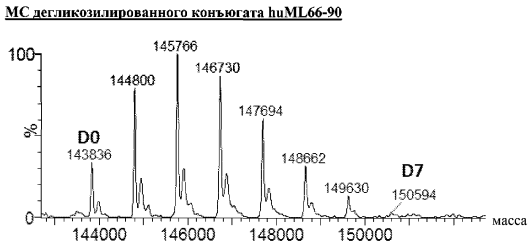
Фиг. 7B



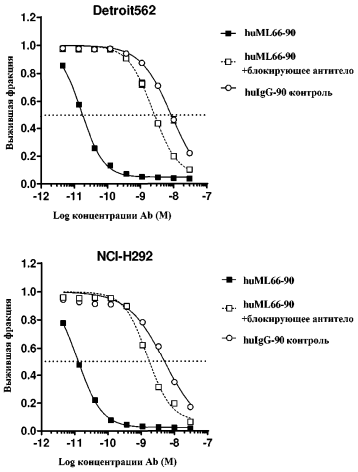
Фиг. 7C



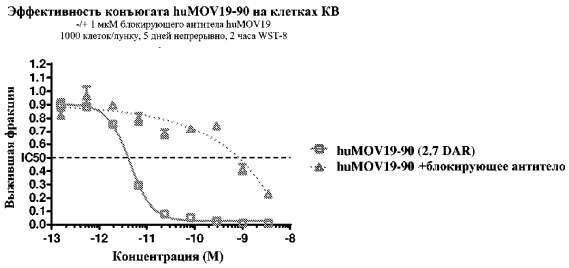
Фиг. 7D



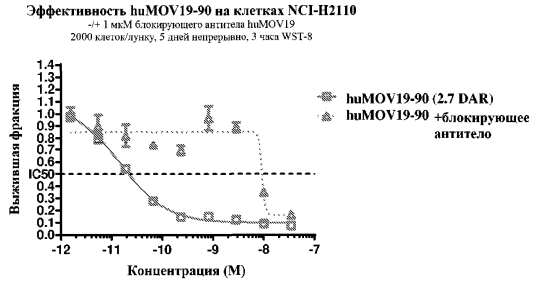
Фиг. 8



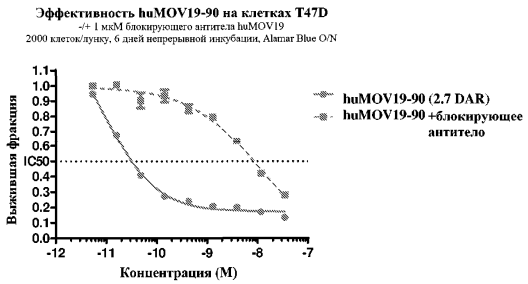
Фиг. 9



Фиг. 10

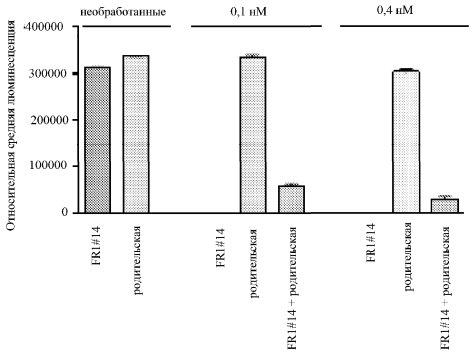


Фиг. 11



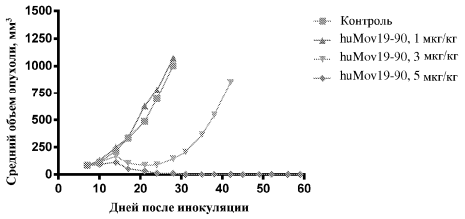
Фиг. 12

huMOV19-90



Фиг. 13

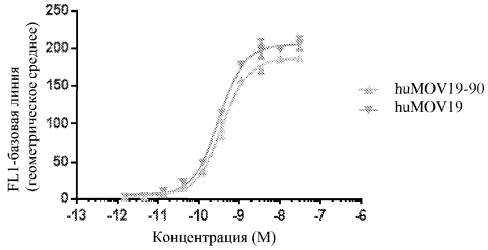
Противоопухолевая активность (средний объем опухоли, мм³) huMov 19-90 у мышей SCID, несущих ксенотрансплантаты NCI-H2110



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

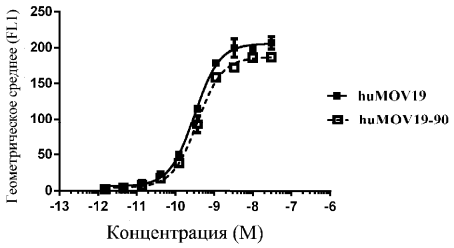
Фиг. 14

Связывание конъюгата huMOV-19-90 на клетках T47D



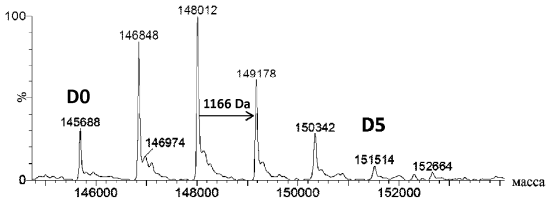
	huMOV19-90	huMOV19
EC50	3,708e-010	3,136e-010

Фиг. 15A



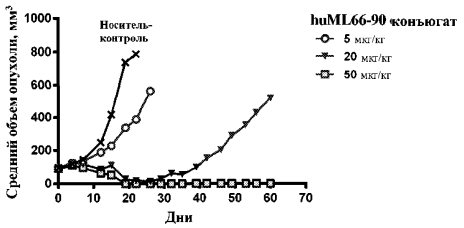
Фиг. 15B

МС дегликозилированного конъюгата huMov19-сульфо-SPDB-107



Фиг. 16

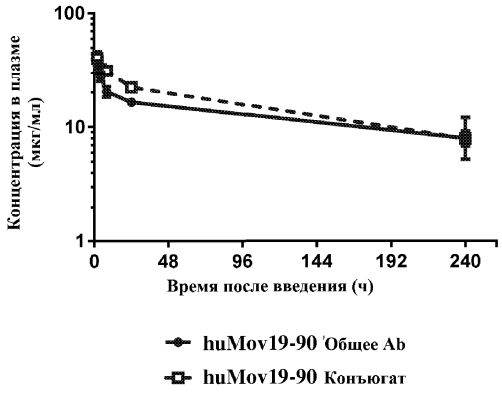
Противоопухолевая активность (средний объем опухоли, мм^3) конъюгата huML66-90 у мышей SCID, несущих ксенотрансплантаты NCI-H1703



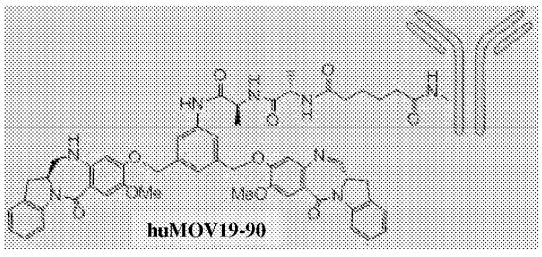
Агент	Доза Соед. 90 (мкг/кг)	Доза Ab (мг/кг)	T/C (%)	CR	Результат
huML66-90 конъюгат	5	0.3	46	0/6	Неактивен
	20	1.1	4	3/6	Высокоактивен
	50	2.8	0	6/6	Высокоактивен

Фиг. 17

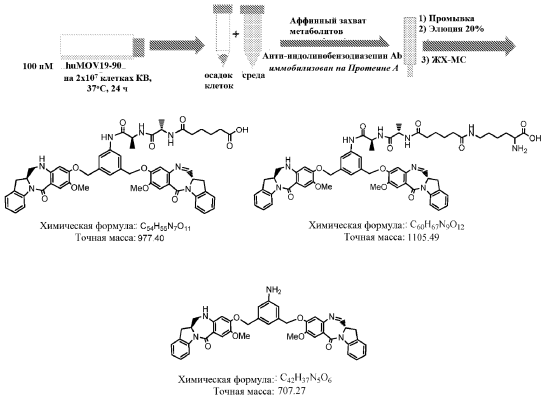
Фармакокинетика huMov19-90 в мышах CD-1



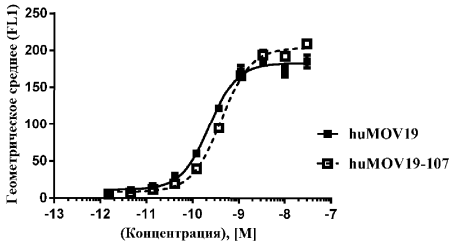
Фиг. 18



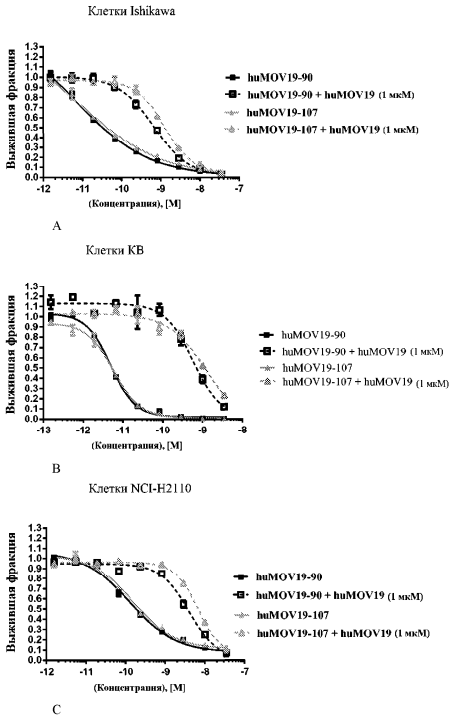
Фиг. 19А



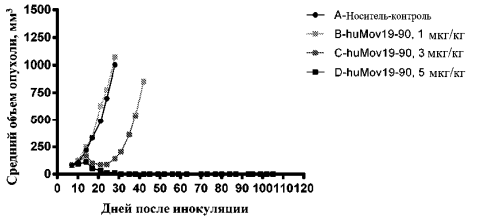
Фиг. 19B



Фиг. 20

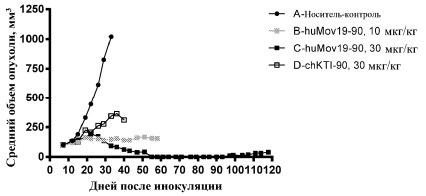


Фиг. 21



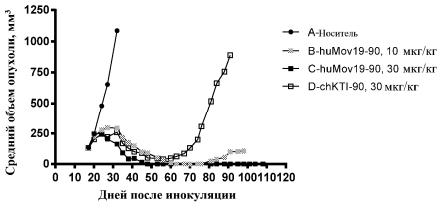
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	T/C (День 24)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	–	–	–	–	–
B	huMov19-90	1	117%	0/6	0/6	Неактивен
C	huMov19-90	3	13%	1/6	0/6	Активен
D	huMov19-90	5	2%	6/6	4/6	Высокоактивен

Фиг. 22



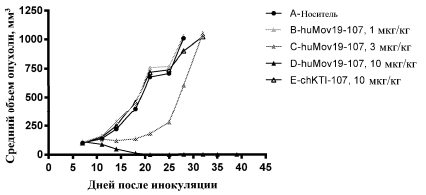
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	T/C (День 33)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	10	15%	1/6	0/6	Активен
C	huMov19-90	30	9%	6/6	6/6	Высокоактивен
D	chKTI-90	30	34%	0/6	0/6	Активен

Фиг. 23



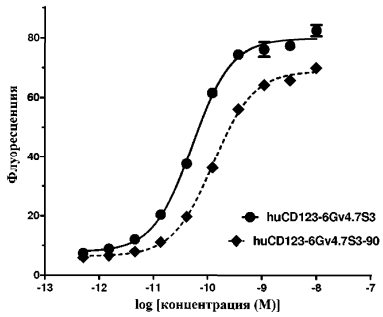
Группа лечения		Доза (мкг/кг)	T/C (День 32)	Регрессии		Результат
				PR	CR	
A	Носитель-контроль	-	-	-	-	-
E	huMov19-90	10	27%	6/6	6/6	Активен
F	huMov19-90	30	15%	6/6	6/6	Активен
G	chKTI-90	30	24%	4/6	0/6	Активен

Фиг. 24



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

Фиг. 25


Флуоресценция
80
60
40
20
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [концентрация (M)]
huCD123-6Gv4.7S3
huCD123-6Gv4.7S3-90

Фиг. 26