

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038512**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.08

(51) Int. Cl. **A61K 47/48** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201500905

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(54) КОНЬЮГАТЫ МАЙТАНСИНОИДОВ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/792,216

(32) 2013.03.15

(33) US

(43) 2017.02.28

(86) PCT/US2014/029757

(87) WO 2014/145090 2014.09.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
Ниттоли Томас (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(56) US-A1-2013029900

J. A. REDDY ET AL.: "Folate Receptor-Specific Antitumor Activity of EC131, a Folate-Maytansinoid Conjugate", CANCER RESEARCH, vol. 67, no. 13, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 6376-6382, XP055135216, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3894 abstract figure 1

J. A. DAVIS ET AL.: "In Vitro Characterization of the Drug-Drug Interaction Potential of Catabolites of Antibody-Maytansinoid Conjugates", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 40, no. 10, 29 June 2012 (2012-06-29), pages 1927-1934, XP055135213, DOI: 10.1124/dmd.112.046169 figure 1

JEFFREY S. C. ET AL.: "Dipeptide-based highly potent doxorubicin antibody conjugates", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 16, no. 2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 358-362, XP027965900, ISSN: 0960-894X [retrieved on 2006-01-15] abstract scheme 3 WO-A1-2014065661

(57) Изобретение относится к соединениям сшивающих агентов, применимых при ковалентном сшивании биологически активных молекул с лигандами. Описываемые соединения также относятся к биологически активным молекулам и конъюгатам лигандов, где биологически активная молекула сшита с лигандом с помощью сшивающего агента. В раскрытии также приводятся составы, включающие в себя конъюгаты биологически активной молекулы-лиганда, методы изменения роста идиобласта и методы лечения с помощью конъюгатов или составов.

B1**038512****038512****B1**

Область техники

В настоящем раскрытии приводятся конъюгаты лиганда - биологически активной молекулы, где лиганд соединен с биологически активной молекулой с помощью сшивающего агента. В настоящем раскрытии также приводятся конъюгатные соединения в лекарственных препаратах для применения в различных терапевтических целях.

Уровень техники

Пролиферативные заболевания характеризуются неконтролируемым ростом и распространением идиобластов. Если распространение не контролируется, это может привести к смерти. Патологическое разрастание, например рак, вызывается как внешними факторами (например, табак, химические вещества, радиация и возбудители инфекции), так и внутренними факторами (наследственные мутации, состояние иммунной системы, мутации, возникшие вследствие метаболизма). Эти причинные факторы могут действовать вместе или последовательно для возбуждения или ускорения патологического разрастания клеток. Рак лечится хирургией, радиотерапией, химиотерапией, гормонами и иммунотерапией. Тем не менее, существует потребность в более эффективных лекарствах против разрастания клеток.

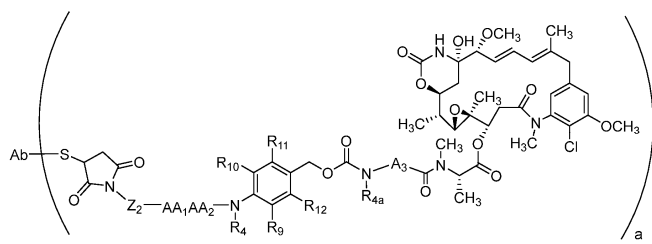
Идеальной терапией разрастания клеток было бы обеспечение нацеленной доставки крайне цитотоксических средств в клетки опухоли и оставление нормальных клеток нетронутыми. Обычное химиотерапевтическое лечение, например, с помощью майтансина, является ограниченным в силу токсичных побочных эффектов, возникающих из-за воздействия препарата на нераковые клетки. Были испробованы различные подходы к целевой доставке лекарств, включая применение конъюгатов, нацеленных на опухоль зондов (таких как антитела или факторы роста) с токсинами, такими как токсины синегнойной палочки или дифтерии, останавливающими синтез белков и клеток. Однако побочные эффекты включали в себя реакцию иммунной системы из-за нечеловеческих компонентов конъюгатов. Более того, полураспад конъюгатов лекарства был ограниченным в силу устранения из сосудистого русла через почечное фильтрование и краткое разрушение, поглощение ретикулоэндотелиальной системой (РЭС), а также накопления в нецелевых органах и тканях.

В другом подходе, чтобы использовать преимущества гиперпроницаемости эндотелия сосудов опухолевой ткани, применяются пассивные переносчики лекарственного препарата, такие как полимеры, липосомы и полимерные мицеллы. Полимерные препараты и макромолекулы накапливаются в плотных опухолях в силу увеличенной проницаемости и механизма удержания. Однако, барьерами на пути применения таких целевых доставок являются быстрая очистка крови от посторонних веществ, а также технологические преграды в получении высоко стандартизированных, фармацевтически приемлемых систем доставки препарата с требуемой специфичностью и избирательностью для фиксации опухолевых клеток.

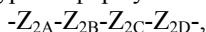
Таким образом, существует потребность в целевых лекарственных препаратах против разрастания клеток.

Краткое описание изобретения

Настоящее раскрытие относится к конъюгатным соединениям, представленным следующей структурной формулой (I):



где Z_2 представлен следующей структурной формулой:



где $-Z_{2A}-$, $-Z_{2B}-$, $-Z_{2C}-$ и $-Z_{2D}-$, каждый независимо, являются отсутствующими, $-C(=O)-$, -алкилен-, или $-C(=S)-N(R_4)-$;

"A" является природным или искусственным аминокислотным остатком или пептидным остатком, имеющим 2-20 аминокислотных остатков;

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

AA_1-AA_2 представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланин остатки;

a представляет собой целое число от 1 до 10;

q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

A_3 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

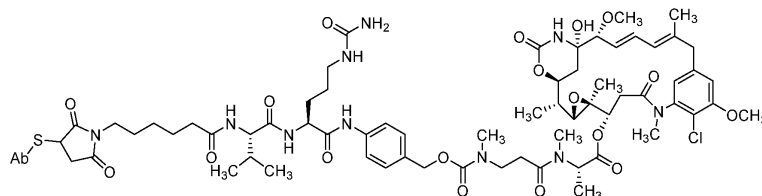
R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} каждый представляет собой независимо водород или C_{1-6} алкил; и

R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.

В одном из вариантов осуществления изобретения q равно 4.

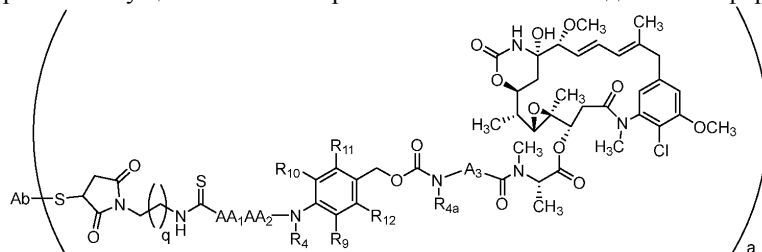
В одном из вариантов осуществления изобретения Ab способен связываться со специально выбранной клеточной популяцией. В одном из вариантов Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающим опухолевый специфический антиген.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к конъюгатным соединениям, представленным следующей структурной формулой (Ia):



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к соединениям формулы (Id)



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

AA_1-AA_2 является пептидным остатком, выбираемым из группы, содержащей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланиновые остатки;

a является целым числом от 1 до 10;

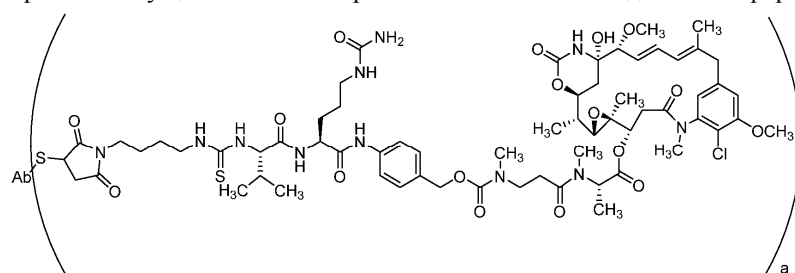
q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

A_3 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} , каждый независимо, представляет собой водород или C_{1-6} алкил; и

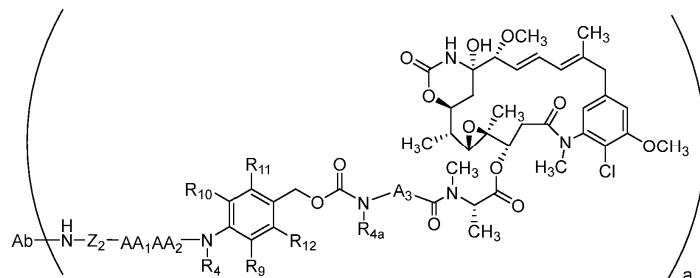
R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к соединениям формулы (Ii)



где a является целым числом от 1 до 10.

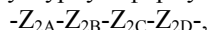
Настоящее изобретение также относится к конъюгатным соединениям, представленным следующей структурной формулой (Ib):



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

a является целым числом от 1 до 10;

Z₂ представляет собой следующую структурную формулу:



где Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} и Z_{2D}, каждый независимо, являются отсутствующими, -C(=O)-, -алкилен-, -арилен-, или -C(=S)-N(R₄)-;

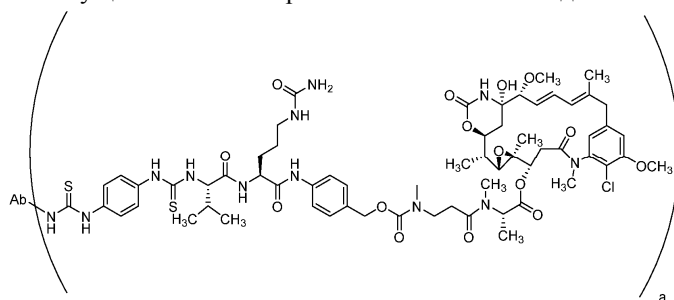
AA₁-AA₂ представляет собой пептидный остаток, выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланин остатки;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, и R₁₂ каждый представляет собой независимо водород или C₁₋₆алкил; и

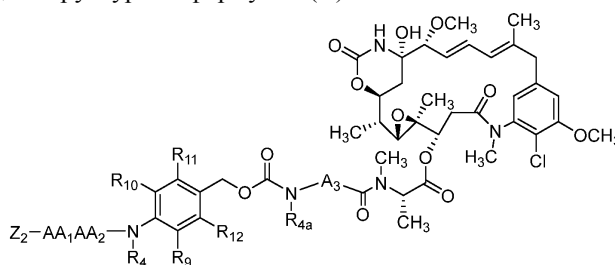
R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

В одном из вариантов осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ic)

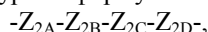


где a является целым числом от 1 до 10.

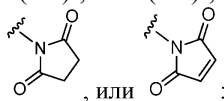
В другом аспекте изобретение направлено на сшивающий агент и биологически активные вещества, представленные следующей структурной формулой (II)



где Z₂ представлен следующей структурной формулой:



где -Z_{2A}-, -Z_{2B}-, -Z_{2C}- и -Z_{2D}-, каждый независимо, от остальных является отсутствующим, алкилом или -алкиленом-, арилом или -ариленом-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S,



q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

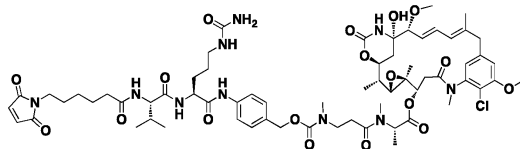
AA₁-AA₂ представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланин остатки;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂-, или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

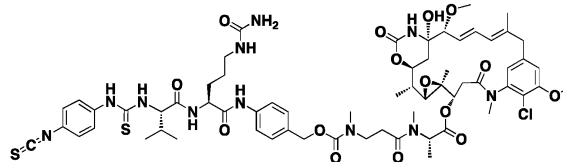
R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, и R₁₂ каждый представляет собой независимо водород или C₁₋₆алкил; и

R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

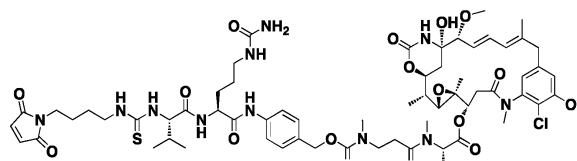
В частных вариантах осуществления изобретения относится к соединениям структурных формул, выбранных из группы, состоящей из (IIa, IIb, IIc):



(IIa)

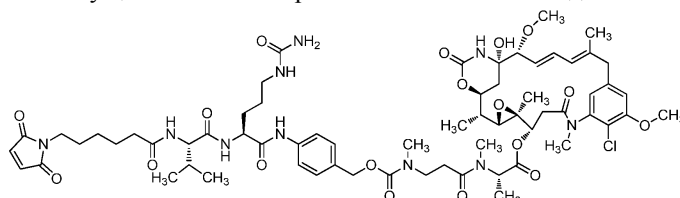


(IIb); и



(IIc)

В ещё одном варианте осуществления изобретение относится к соединению формулы (IId)



Настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему терапевтически эффективное количество соединения формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых переносчиков, разбавителей или субстанций.

В настоящем изобретении также приводится метод снижения, замедления или остановки роста идиобластов, состоящий из взаимодействия соединения формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) с идиобластом в количестве, достаточном для замедления, снижения или остановки роста идиобласта, и при котором рост идиобластов замедляется, снижается или останавливается.

В настоящем изобретении также приводится метод ликвидации клетки, состоящий из взаимодействия соединения формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), в количестве, достаточном для гибели клетки, и при котором клетка погибает.

В настоящем изобретении также приводится метод лечения заболевания у физического лица, страдающего от болезни, состоящий из назначения этому лицу эффективного объема препарата, содержащего соединение формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii).

В настоящем изобретении также приводится метод уменьшения размера опухоли, остановки роста опухоли, уменьшения прогрессии опухоли, или предотвращения прогрессии опухоли у соответствующего лица, состоящий из назначения этому лицу эффективного объема препарата для уменьшения размера опухоли, остановки роста опухоли, уменьшения прогрессии опухоли, или предотвращения прогрессии опухоли, при котором препарат содержит в своем составе соединение формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii).

Настоящее изобретение также относится к предшественнику соединений биологически активной молекулы со сшивающим агентом, в виде, представленном формулами (II, IIa, IIb, IIc, IIId). Соединения формул (II, IIa, IIb, IIc, IIId) предоставляют структурные элементы для сопряженных соединений формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii). В дополнение, соединения формул (II, IIa, IIb, IIc, IIId) могут быть представлены в виде препаратов, лекарственных препаратов и их фармацевтически приемлемых солей.

Кроме этого, в настоящее изобретение включено применение любого из препаратов, имеющих в составе соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и/или фармацевтические композиции при производстве медикаментов для лечения, профилактики и/или улучшения состояния при заболевании.

Кроме этого, в настоящее изобретение включено применение любого из препаратов, имеющих в составе соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и/или фармацевтические композиции при производстве медикаментов для лечения, профилактики и/или улучшения состояния при опухоли.

Краткое пояснение к фигурам

Фиг. 1-8 показывают результаты испытаний жизнеспособности клетки, в которых, в искусственных условиях, были выращены различные линии раковых клеток, и подвергнуты воздействию антител серий-

ного разведения, лекарственного вещества, не связанного с белками плазмы крови, или, как показано, конъюгатов антитело-медикамент. Процент жизнеспособности был установлен в соответствии с методами, приведенными в примере 14.

Фиг. 1А показывает результаты жизнеспособности клеток C4-2 (линия клеток рака предстательной железы), подвергшихся воздействию соединения 2, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 3 ("Изотипический контроль-3"), анти-ПСМА (простатического специфического мембранного антигена) антитела, сопряженного с соединением 3 ("ПСМА-3"), и не сопряженного анти-ПСМА антитела ("ПСМА").

Фиг. 1В показывает результаты жизнеспособности клеток C4-2 (линия клеток рака предстательной железы), подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-ПСМА антитела, сопряженного с соединением 7 ("ПСМА-7"), и не сопряженного анти-ПСМА антитела ("ПСМА").

Фиг. 1С показывает результаты жизнеспособности клеток C4-2 (линия клеток рака предстательной железы), подвергшихся воздействию соединения 25, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 21 ("Изотипический контроль-21"), анти-ПСМА (простатического специфического мембранного антигена) антитела, сопряженного с соединением 21 ("ПСМА-21"), и не сопряженного анти-ПСМА антитела ("ПСМА").

Фиг. 2 показывает результаты жизнеспособности клеток PC3/hSTEAP1 (линия клеток рака предстательной железы, выражающая экзогенный hSTEAP1), подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-STEAP1 антитела, сопряженного с соединением 7 ("STEAP1-7"), и не сопряженного анти-STEAP1 антитела ("STEAP1").

Фиг. 3 показывает результаты жизнеспособности клеток T47D (линия клеток рака молочной железы) подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-PRLR антитела, сопряженного с соединением 7 ("PRLR-7"), и не сопряженного анти-PRLR антитела ("PRLR").

Фиг. 4 показывает результаты жизнеспособности клеток HEK293/hEGFRvIII (клетки HEK293, выражающие экзогенный hEGFRvIII), подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-EGFRvIII антитела, сопряженного с соединением 7 ("EGFRvIII-7"), и не сопряженного анти-EGFRvIII антитела ("EGFRvIII").

Фиг. 5 показывает результаты жизнеспособности клеток MMT/hEGFRvIII (клетки MMT, выражающие экзогенный hEGFRvIII), подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-EGFRvIII антитела, сопряженного с соединением 7 ("EGFRvIII-7"), и не сопряженного анти-EGFRvIII антитела ("EGFRvIII").

Фиг. 6 показывает результаты жизнеспособности клеток U251/hEGFRvIII (клетки U251, выражающие экзогенный hEGFRvIII), подвергшихся воздействию соединения 6, изотипического контроля антитела, сопряженного с соединением 7 ("Изотипический контроль-7"), анти-EGFRvIII антитела, сопряженного с соединением 7 ("EGFRvIII-7"), и не сопряженного анти-EGFRvIII антитела ("EGFRvIII").

Фиг. 7, части А и В показывают, соответственно, результаты жизнеспособности клеток HEK293 и U87MG, подвергшихся воздействию соединений 6, 27, 29, и 31 (все несопряженные).

Фиг. 8, части А-Е показывают, соответственно, результаты жизнеспособности клеток HEK293, U251, C4-2, PC3 и MMT, подвергшихся воздействию соединений 6, 9, 33, и 35 (все несопряженные).

Подробное описание

Приведенные в данном описании ссылки на определенные примеры осуществления считаются только наглядными пояснениями принципов настоящего раскрытия. Более того, так как для специалистов многочисленные варианты и изменения будут очевидно выражены, то ограничение раскрытия описанными в настоящем документе конкретными конструкциями и процессами, не предполагается. Соответствующим образом, можно будет прибегать ко всем подходящим вариантам и аналогам, попадающим в сферу раскрытия, и определенным последующими формулами изобретения.

Слова "содержать", "состоящий из", "включать" и "включая", при использовании в настоящем описании и в последующих формулах изобретения, предназначены для уточнения наличия указанных свойств, целых чисел, компонентов или этапов, но они не исключают наличия или добавления одного или нескольких их дополнительных свойств, целых чисел, компонентов или этапов.

Общие термины, использованные в любом из примеров осуществления в настоящем документе, могут быть определены следующим образом; однако, указанное значение не должно толковаться как ограничивающее состав термина самим собой.

Термин "конъюгатный", как используется в настоящем документе, относится к лиганду, сшивающему агенту и биологически активной молекуле. Наглядные примеры включают в себя соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii).

Термин "буфер", как используется в настоящем документе, относится к химическим структурным элементам сшивающего агента, используемого для пространственного отделения лиганда от биологически активной молекулы, а также для получения возможности разложения сшивающего агента внутри

клеток. Буфер может быть представлен Z_1 и Z_2 .

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

Термин "алкил", как используется в настоящем документе, относится к группе углеводородов, имеющей общую формулу C_nH_{2n+1} . Примеры алкила включают в себя: метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, 1-бутил и им подобные. Типичный алкил имеет от одного до десяти атомов углерода, от одного до девяти атомов углерода, от одного до восьми атомов углерода, от одного до семи атомов углерода, от одного до шести атомов углерода, от одного до пяти атомов углерода, от одного до четырех атомов углерода, от одного до трех атомов углерода, от одного до двух атомов углерода или один атом углерода.

Термин "арил", как используется в настоящем документе, относится к одновалентным или полициклическим ароматическим углеводородам, имеющих, как правило, от 6 до 18 атомов углерода. Примерами арила являются фенил (подобный бензолу), замещенные бензолы, нафтаден, антрацен, инденил, тетрагидронафтил, и им подобные.

Термин "алкенил", как используется в настоящем документе, относится к алифатическому линейному или разветвленному одновалентному углеводородному радикалу из двух или нескольких атомов углерода, с, как минимум, одним местом ненасыщенности. Алкенил имеет общую формулу $R_2C=CR_2$. Примеры алкенила включают в себя: этиленил, винил, аллил и тому подобные.

Термин "алкинил", как используется в настоящем документе, относится к одновалентному алифатическому углеводородному радикалу, имеющему тройную связь. Типичный алкинил состоит из двух и до двадцати атомов углерода (и имеет, как минимум, одну тройную связь). Примеры алкинила включают в себя этинил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, гексинил и тому подобные.

Термин "циклоалкил", как используется в настоящем документе, относится к одновалентному насыщенному радикалу карбоциклического кольца. Типичный циклоалкил состоит из от 3 до 7 элементных моноциклических кольцевых радикалов. Одним примером циклоалкила является циклогексил.

Термин "гетероарил", как используется в настоящем документе, относится к одновалентному ароматическому радикалу из 5 или 6 элементных колец. Гетероарил включает в себя системы с сочлененными кольцами (как минимум одна должна быть ароматической), имеющих вплоть до от 5 до 18 атомов, содержащие один или несколько гетероатомов, выбранных из азота, серы или кислорода. Наглядными примерами гетероарила являются пиридинил, триазолил, фурил, пиазинил, тиенил, изоксазолил, индазолил, фуразанил, бензотиазофил, квиназолинил и фуоропиридинил.

Термин "гетероциклил", как используется в настоящем документе, относится к насыщенному или частично насыщенному карбоциклическому радикалу, как правило, из от 3 до 18 атомов углерода, в котором, как минимум, один кольцевой атом является гетероатомом, выбранным из азота, кислорода, фосфора и серы. Гетероциклил может быть, например, моноциклическим или бициклическим. Примерами гетероциклила являются пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидропиранил, тиоксанил, 2Н-пиранил, диоксанил, дитипнил, пиперидин и им подобные.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль", как используется в настоящем документе, относится как к органическим, так и неорганическим солям, описанным в настоящем документе конъюгатных соединений, например, соединениям формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii). Соли являются фармацевтически приемлемыми, и включают в себя: сульфаты, цитраты, нитраты, фосфаты, аскорбаты, бромиды, глюконаты, бензоаты, оксалаты, пантотенаты и им подобные. Следует обратить внимание на то, что фармацевтически приемлемые соли настоящего документа могут в своей структуре иметь более одного заряженного атома, а также один или несколько противоионов. Приготовление конъюгатных соединений из настоящего документа в виде фармацевтически приемлемых солей хорошо известно специалистам.

Термин "человеческое антитело", как используется в настоящем документе, предназначен для охвата антител, имеющих переменные и постоянные области, полученные из цепочек человеческого иммуноглобулина.

Человеческие моноклональные антитела (mAbs) изобретения могут включать в себя остатки аминокислот, некодированные цепочками человеческого иммуноглобулина (напр., мутации, вызванные случайным или зависящим от местных условий мутагенезом в искусственных условиях, или соматической мутацией в естественных условиях), например, в комплементарно определяемых областях (CDR), в частности, в CDR3. Однако, термин "человеческое антитело" как используется в настоящем документе, не предназначен для охвата моноклональных антител, в которых цепочки CDR полученных из генеративных линий других млекопитающих видов, привитых к человеческим FR цепочкам.

Термин "терапевтически эффективное количество", как используется в настоящем документе, относится количеству, дающему необходимый эффект, для которого он назначается. Точный объем будет зависеть от цели лечения, и будет определенным специалистом с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Лиганды и партнеры по связыванию

Эффективность конъюгатного соединения из описанных в настоящем документе примеров осуществления зависит от избирательности лиганда связываться со своим партнером по связыванию.

В одном примере осуществления лигандами являются любые молекулы, способные с некоторой

специфичностью к связыванию с заданным партнером в млекопитающем, где взаимодействие может быть использовано в терапии. В некоторых аспектах лиганд способен связываться с клеткой или клеточной популяцией.

Используемыми в настоящем документе лигандами являются антитела, лимфокины, гормоны, факторы роста, вирусные рецепторы, интерлейкины, или любые другие, связывающие клетки или пептиды молекулы или вещества.

В одном примере осуществления лигандом является антитело. Как установлено в настоящем документе, антитело относится к моноклональным антителам, поликлональным антителам, фрагментам антитела (Fab, Fab', и F(ab)2, мини антителам, дителам, триотелам и им подобным), и биспецифическим антителам. В настоящем документе, антитела могут очеловечиваться с помощью методов, описанных в патенте США № 6,596,541, и патентной заявке США №2012/0096572, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

Когда лиганд является антителом, он связывается со связывающим партнером антигена, являющимся полипептидом, и может являться трансмембранной молекулой (напр., рецептором) или фактором роста. Примеры антигенов включают в себя, но не ограничиваются, молекулы, такие как ренин; гормон роста, включая человеческий гормон роста и гормон роста крупного рогатого скота; фактор, стимулирующий выделение гормона роста; гормон парашитовидной железы; тиреостимулирующий гормон; липопротеины; альфа-антитрипсин; инсулин А-цепочки; инсулин В-цепочки; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; тиреокальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор "vmc", фактор IX, тканевой тромбопластин (ТТ), и фактор фон Виллебранда; факторы, препятствующие свертыванию крови, такие как протеин С; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активатор плазмогена, такой как урокиназа или человеческая моча или тканевой активатор плазминогена (t-PA); бомбезин; тромбин; гемопоэтический фактор роста; факторы некроза опухолей альфа и бета; энкефалиназа; RANTES, хемокин, выделяемый Т-клетками при активации (регулируемый при активации обычно выраженных и выделяемых Т-клеток); человеческий макрофагальный белок воспаления (MIP-I-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; мюллерова ингибирующая субстанция; релаксин А-цепочки; релаксин В-цепочки; прорелаксин; мышинный гонадотропинсвязанный пептид; микробный белок, такой как бета-лактамаза; DNase; 19E; цитотоксический Т-лимфоцит связанный антиген (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы гормонов или факторы роста; протеин А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как производимый из костей нейротрофический фактор (BDNF), нейротропин-3, -4, -5, или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6), или фактор роста нервов такой как NGF-β; фактор роста тромбоцитов (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; рецептор 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), эпидермальный фактор роста (ЭФР); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 или TGF-β5; инсулиноподобный ростовой фактор-I и -II (ИФР-I и ИФР-II) (IGF-I ; IGF-II); des(I-3)-IGF-I (мозговой ИФР-I), инсулиноподобный ростовой фактор связывающий белок, EpcAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, рецепторы EphA, рецепторы EphB, фолатный рецептор, FOLRI, мезотелин, крипто, альфаубетаб, интегрин, VEGF, VEGFR, EGFR, трансферриновый рецептор, 1RTAI, 1RTA2, 1RTA3, 1RTA4, 1RTA5; CD такие протеины, как 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, CD134, CD137, CD138, CD152, или антитело, которое связывается с одним или несколькими опухолевыми антигенами, или рецепторами клеточной поверхности, как раскрыто в публикациях США № 2008/0171040 или №2008/0305044, и полностью включенные в данный документ посредством ссылок; эритропоэтин; остеиндуктивные факторы; иммунотоксины; костный морфогенетический белок (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), напр., M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (IL), напр., от IL-1 до IL-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; белки оболочки; фактор распада; вирусный антиген, например, часть оболочки герпесвируса кошек; транспортные белки; "хоминг"-рецепторы; адресины; регуляторные белки; интегрин, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, молекулы межклеточной адгезии (ICAM), VLA-4 и VCAM; опухолевый специфический антиген, такой как белки AFP, ALK, B7H4, BAGE, бета-катенин, ген "bcr-abl", BRCA1, BORIS, CA9 (карбоангидраза IX), каспаза-8, CD20, CD40, CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, рецепторная тирозинкиназа, продукт гена KIT, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, эндоглин, адгезивная молекула эпителиальных клеток, EphA2, ErbB2/Fler2, ErbB3/Her3, ErbB4/HeR4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (напр., GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, белки MAGE (напр., MAGE-1, -2, -3, -4, -6, и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Mucl, Mucl6 (CA-125), MUM1, NA17, NGEF, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR-α, PDGFR-β, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-I, SART-3, Steap-1, Steap-2, STn, сурвивин, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, Tn, TNFRSF17,

TRP-1, TRP-2, тирозиназа и уроплакин-3, и фрагменты любого из вышеперечисленных полипептидов.

Лиганды также могут включать в себя белки с анкириновым повтором, интерфероны, лимфокины такие как IL-2 или IL-3, гормоны, такие как инсулин и глюкокортикоиды, факторы роста, такие как ЭФР (EGF), трансферрин, фибронектин типа III, и т.п.

Приведенные в настоящем документе примеры осуществления являются направленными на терапевтическое применение. В одном примере осуществления лиганды готовятся для взаимодействия и связывания с антигенами, определенными как опухолевые антигены, в том числе антигены, специфичные для вида опухоли, или антигены, которые распределены, сверхэкспрессированы или модифицированы в конкретном типе опухоли. Примеры включают в себя: альфа-актинин-4 при раке легких, ARTC1 при меланоме, BCR-ABL фузоген при хроническом миелолейкозе, B-RAF, CLPP или Cdc27 при меланоме, CASP-8 при плоскоклеточной карциноме, и hsp70-2 при почечно-клеточной карциноме, а также следующие распределенные опухолевые специфические антигены, например: BAGE-1, GAGE, GnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2.

Биологически активные молекулы

В настоящем документе биологически активные молекулы включают в себя любые молекулы, имеющие терапевтический эффект на млекопитающих. В типичных примерах осуществления, молекула успешно доставляется до цели в млекопитающем, и, в частности, успешно доставляется до, и внутрь клетки (напр., эндцитоз), по сравнению с молекулами, выпускающимися в сосудистую или лимфатическую системы.

С одной стороны, биологически активные молекулы являются соединениями, приводящими к угнетению, замедлению, снижению и/или предотвращению пролиферации клеток. Биологически активные молекулы также могут приводить к гибели клеток путем их некроза или апоптоза. Наглядным примером биологически активных молекул для использования в описанных в настоящем документе конъюгатных соединениях являются: майтанзиноид (напр., DM1, DM4 и т.п.), ауристатин (напр., MMAE, MMAD, MMAF и т.п.), дуокармицин (напр., MGBA), доластатин, токсиды и другие химиотерапевтически эффективные лекарства.

Другими конкретными примерами биологически активных молекул для использования в контексте настоящего изобретения, являются, например, 1-дегидротестостерон, 2-пирролинодоксорибицин, 5-флуороурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, актиномицин D, антрациклин, антрамицин (AMC), блеомицин, бусульфид, калихемицины, кармустин, цисплатин, колхицин, цианоморфолино-доксорибицин, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин B, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, дибромомантол, дигидроксид антрациклина, доксорибицин, эметин, эпирубицин, этидия бромид, этопозид, грамицидин D, глюкокортикоиды, лидокаин, ломустин (CCNU), мехлоретамин, мелфалан, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, морфолино-доксорибицин, прокаин, пропранолол, пурамицин, пиролобензодиазапины, сибиромидин, стрептозотозин, таксол, тенопозид, тетракаин, тиюпа хлорамбуцил, трихотехины, тубулизин, винкристин, а также стереоизомеры, изостеры, аналоги или производные от любого из вышеупомянутых.

В одном примере осуществления биологически активной молекулой является майтанзиноид или аналог майтанзиноида. Примеры майтанзиноидов для использования в настоящем документе описаны Widdison и др., в J. Med. Chem., 2006, 49, стр. 4392-4408, для всех целей включенные в данный документ посредством ссылок.

Материалы сшивающего агента

В настоящее изобретение включено соединение сшивающего агента, химически способного к ковалентной связи двух химических молекул. Сшивающий агент связывает две молекулы. Например, сшивающий агент может связать лиганд и биологически активную молекулу. С одной стороны, сшивающий агент является саморасщепляющимся, и, в случае связи сшивающим агентом двух или более химических молекул, высвобождает, как минимум, одну из указанных химических молекул в присутствии фермента. С другой стороны, сшивающий агент может прикрепляться к другим химическим молекулам, включая, но не ограничиваясь, аналитические средства, биомолекулы, нацеливающие средства, детектируемые метки, диагностические средства, и тому подобные. В одном примере осуществления, сшивающий агент соединяет биологически активную молекулу с лигандом. В другом примере осуществления, сшивающий агент соединяет биологически активный макролид с лигандом. В еще одном примере осуществления, сшивающий агент соединяет биологически активный макролид с антителом, или их комбинациями.

С одной стороны, сшивающие агенты полезны для ковалентной связи лигандов с терапевтическими средствами и маркерами. С другой стороны, сшивающие агенты улучшают химическую и/или системную устойчивость прикрепленных молекул. С другой стороны, сшивающие агенты снижают физиологическую токсичность прикрепленных молекул. С другой стороны, сшивающие агенты улучшают фармакокинетику, фармакодинамику и/или биологическую доступность прикрепленных молекул. С одной стороны, сшивающие агенты высвобождают биологически активную молекулу в месте, или вблизи целевой клетки или клеточной популяции в фармакологически эффективной форме. С одной стороны, высвобождение производится ферментами. С одной стороны, расположенные на сшивающих агентах группы для ферментного расщепления включают в себя, но не ограничиваются, пептидные связи, сложные эфирные

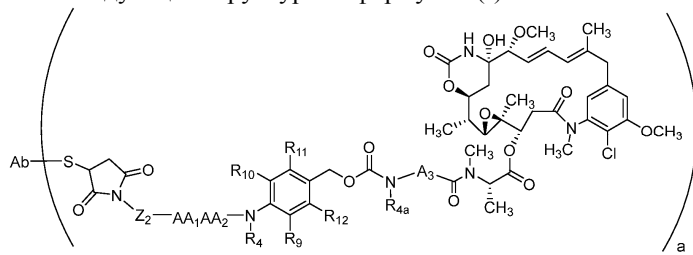
связи и бисульфидные соединения. С другой стороны, сшивающий агент расщепляется с помощью изменений уровня кислотности, pH.

В соответствии с определенными примерами осуществления, сшивающие агенты, биологически активные молекулы и другие соединения настоящего изобретения, могут соединяться с антителом или антигенсвязывающей молекулой путем прикрепления к определенной аминокислоте антитела или антигенсвязывающей молекулы. Примеры прикрепления к аминокислоте, которые могут использоваться в контексте раскрытия, включают в себя, напр., лизин (см. напр., US 5,208,020; US2010/0129314; Hollander и др., Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (см., напр., US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7,750,116), селеноцистеин (см., напр., WO 2008/122039; и Hofer и др., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105:12451-12456), формил глицин (см., напр., Carrico и др., Nat. Chem. Biol, 2007, 3:321-322; Agarwal и др., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110:46-51, и Rabuka и др., Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067), искусственные аминокислоты (см., напр., WO 2013/068874, и WO 2012/166559), и кислые аминокислоты (см., напр., WO 2012/05982). Сшивающие агенты также могут быть сопряжены с антигенсвязывающим белком путем прикрепления к углеводам (см., напр., патентную заявку США 2008/0305497, и Ryan и др., Food & Agriculture Immunol., 2001,13:127-130), и дисульфидным сшивающим агентам (см., напр., WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, и Shaunak и др., Nat. Chem. Biol, 2006, 2:312- 313).

В соответствии с другими определенными примерами осуществления, сшивающие агенты, биологически активные молекулы, такие как лекарственные препараты, могут соединяться с антителом или антигенсвязывающей молекулой путем прикрепления к определенной аминокислоте антитела или антигенсвязывающей молекулы, образуя конъюгат антитела с лекарственным препаратом (ADC).

Соединения

В одном аспекте настоящего изобретения приводятся конъюгаты биологически активной молекулы и лиганда, представленные следующей структурной формулой (I):



где Z_2 представлен следующей структурной формулой

$-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-$,

где $-Z_{2A}-$, $-Z_{2B}-$, $-Z_{2C}-$, и $-Z_{2D}-$ каждый независимо являются отсутствующими, $-C(=O)-$, $-алкилен-$, или $-C(=S)-N(R_4)-$;

"A" является природным или искусственным аминокислотным остатком, или пептидным остатком, имеющим 2-20 аминокислотных остатков;

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

AA_1-AA_2 представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланин остатки;

a представляет собой целое число от 1 до 10;

q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

A_3 представляет собой $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$;

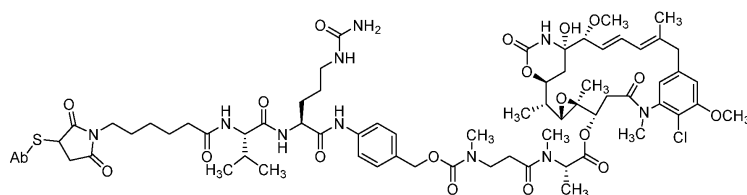
R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} каждый представляет собой независимо водород или C_{1-6} алкил; и

R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.

В одном из вариантов осуществления изобретения q равно 4.

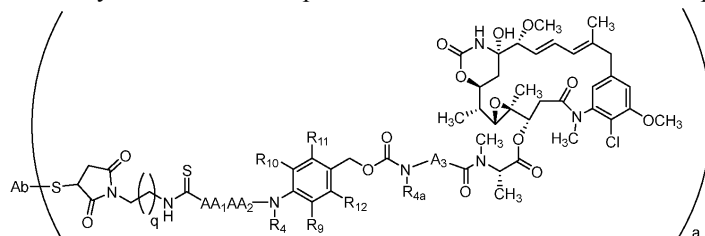
В одном из вариантов осуществления изобретения Ab способен связываться со специально выбранной клеточной популяцией. В одном из вариантов Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающим опухолевый специфический антиген.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к конъюгатным соединениям, представленным следующей структурной формулой (Ia):



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном из вариантов осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Id):



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

AA₁-AA₂ является пептидным остатком, выбираемым из группы, содержащей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланиновые остатки;

a является целым числом от 1 до 10;

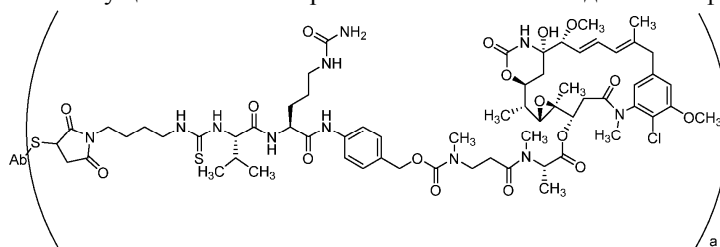
q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂-, или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, и R₁₂, каждый независимо, представляет собой водород или C₁₋₆алкил; и

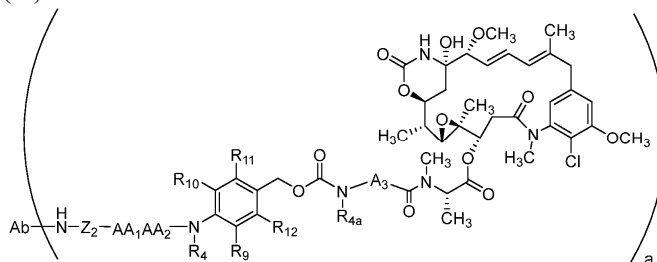
R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к соединениям формулы (Ii):



где a является целым числом от 1 до 10.

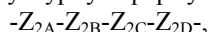
Настоящее изобретение также относится к конъюгатным соединениям, представленным следующей структурной формулой (Ib):



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

a является целым числом от 1 до 10;

Z₂ представляет собой следующую структурную формулу:



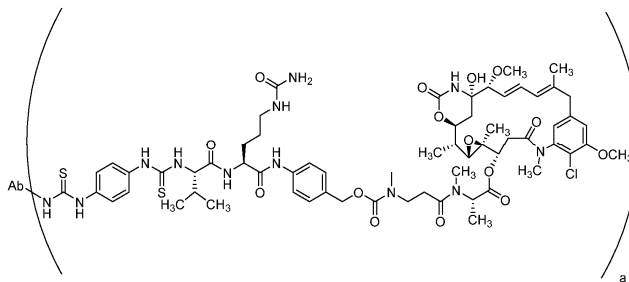
где Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} и Z_{2D}, каждый независимо, являются отсутствующими, -C(=O)-, -алкилен-, -арилен-, или -C(=S)-N(R₄)-;

AA₁-AA₂ представляет собой пептидный остаток, выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланин остатки;

A_3 представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} каждый представляет собой независимо водород или C_{1-6} алкил; и R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.

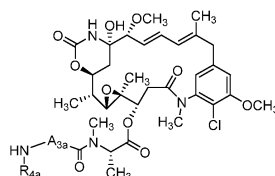
В одном из вариантов осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ic)



где a является целым числом от 1 до 10.

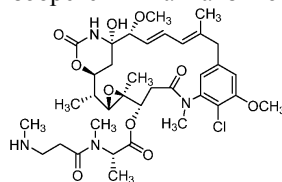
В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям, в которых биологически активной молекулой является цитотоксичный биологически активный макролид.

В одном варианте осуществления биологически активные макролиды являются майтанзиноидами, представленными формулой (III)

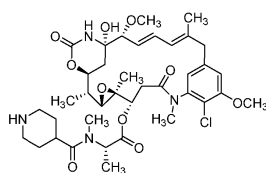
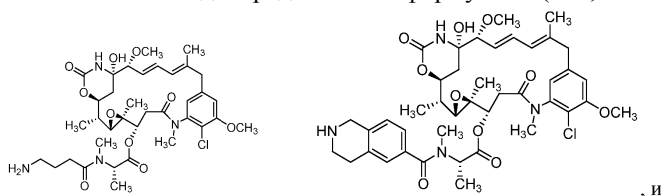


где A_{3a} представляет собой $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.

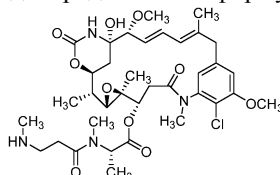
В ещё одном варианте настоящего изобретения майтанзиноиды представлены формулой (IIIa):



В еще одном варианте майтанзиноиды представлены формулами (IVa, IVb и IVc):



В еще одном варианте майтанзиноиды представлены формулой (IVd)



В одном варианте изобретения приводится соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), где лиганд способен связываться с клеткой или клеточной популяцией.

В другом варианте изобретения приводится соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), где лиганд выбирается из группы, состоящей из белков, антител, фрагментов антител, нуклеиновых кислот, антигенсвязывающих остовов и углеводов.

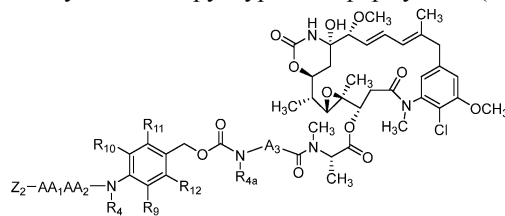
В одном примере осуществления изобретения приводится соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), где лигандом является антитело или его фрагмент.

В одном примере осуществления изобретения приводится соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), где лигандом является антитело или его фрагмент, специфически связывающие опухолевый специфический антиген.

В одном примере осуществления изобретения приводится соединение формул (I, Ia, Ic, Id), где антитело или его фрагмент имеют сернистую группу, прикрепленную ковалентной связью к Z_2 .

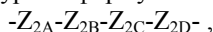
В одном примере осуществления изобретения приводится соединение формулы (Ib), где антитело или его фрагмент имеют сернистую группу, прикрепленную ковалентной связью к Z_{2A} .

В одном аспекте изобретение относится к соединениям сшивающего агента и биологически активных веществ, представленным следующими структурными формулами (II, IIa, IIb, IIc, IId):

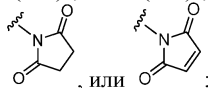


(II)

где Z_2 представлен следующей структурной формулой:



где $-Z_{2A}-$, $-Z_{2B}-$, $-Z_{2C}-$ и $-Z_{2D}-$, каждый независимо от остальных, является отсутствующим, алкилом или -алкиленом-, арилом или -ариленом-, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$,



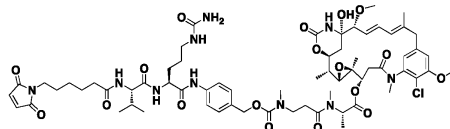
q представляет собой ноль или целое число от 1 до 5;

AA_1-AA_2 представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин, и аспарагин-аланин остатки;

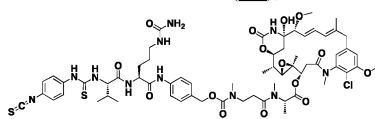
A_3 представляет собой $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} каждый представляет собой независимо водород или C_{1-6} алкил; и

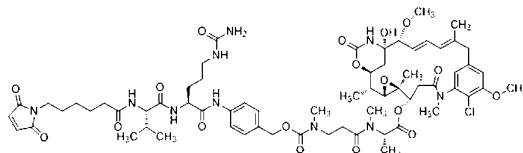
R_{4a} представляет собой C_{1-6} алкил.



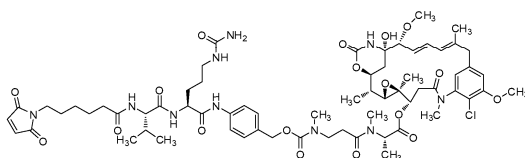
(IIa),



(IIb),



(IIc) и



(IIId)

В одном варианте изобретения IC₅₀ соединений превышает примерно 10 нМ.

В одном варианте приводятся соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и (II, IIa, IIb, IIc, IId), где А является пептидом, расщепляемым с помощью протеазы.

В ещё одном варианте приводятся соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и (II, IIa, IIb, IIc, IId), где "А" является пептидом, расщепляемым с помощью протеазы в опухолевой ткани.

В примере осуществления изобретения приводятся соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и (II, IIa, IIb, IIc, IId), где "А" является пептидом, расщепляемым с помощью протеазы, и протеаза является катепсином или плазмином.

Составы

Примеры осуществления изобретения описывают составы, включающие в себя конъюгатные соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), а также их смеси. В некоторых вариантах, соединение далее представлено соединением формул (II, IIa, IIb, IIc, IId).

Составами могут быть лекарственные препараты, далее включающие в себя один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и/или субстанций. В некоторых вариантах лекарственным препаратом является фармацевтически приемлемая соль составов формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и (II, IIa, IIb, IIc, IId) или их смесей.

Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и субстанции известны специалистам, и могут быть определены средним специалистом как обоснование клинической ситуации. Примерами подходящих носителей, разбавителей и субстанций включают в себя: буферы для сохранения правильной кислотности состава (напр., цитратные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, лактатные буферы, оксалатные буферы и т. п.), белки-носители (напр., человеческий сывороточный альбумин), физиологический раствор, полиолы (напр., трегалоза, сахароза, ксилит, сорбит и т.п.), сурфактанты (напр., полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксолат, и т.п.), антибактериальные препараты и антиоксиданты.

По желанию, лекарственные препараты настоящего документа могут включать в себя второе или более лечебных средств (напр., стимулятор конъюгатных соединений формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), противоопухолевые вещества, антибиотики, противовоспалительные средства, и т. п.). Второе лечебное средство может быть включено в тот же состав, что и соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), или (II, IIa, IIb, IIc, IId), или может вводиться отдельно от соединений формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или (II, IIa, IIb, IIc, IId) (по времени, или типу и месту введения).

Специалист в области биологически активных молекул поймет, что каждое из соединений формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или (II, IIa, IIb, IIc, IId) может быть изменено таким образом, что получившееся соединение по-прежнему сохраняет специфичность и/или активность, идентичную начальному соединению. В этом свете, биологически активная молекула соединений формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или (II, IIa, IIb, IIc, IId) может включать в себя все возможные аналоги и производные биологически активных молекул. В одном примере осуществления, биологически активными молекулами являются макролид, а далее и майтансин, или аналог майтансина, как описано в публикации Widdison и др., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408.

В одном варианте приводится лекарственный препарат, состоящий из терапевтически эффективно количества соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или его фармацевтически приемлемой соли, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или субстанций.

В другом варианте, приводится лекарственный препарат, состоящий из терапевтически эффективного количества соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) или (II, IIa, IIb, IIc, IId), или его фармацевтически приемлемой соли, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или субстанций.

В другом варианте, приводится лекарственный препарат, состоящий из терапевтически эффективного количества соединения формул (II, IIa, IIb, IIc, IId) или его фармацевтически приемлемой соли, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или субстанций.

Способ применения

Как описано выше, конъюгатные соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) могут быть получены с различными функциональными группами, в результате чего лиганд прикрепляется к сшивающему агенту, и посредством этого биологически активная молекула образует ковалентный конъюгат. Лиганд специально нацеливается на сопряжение соединения с партнером по связыванию лиганда, как правило, полипептидом, или другим подобным антигеном. В типичном примере осуществления, конъюгат предназначен для включения лиганда, имеющего партнера по связыванию, находящегося в клетках, испытывающих рост идиобластов, или клеток, соучаствующих в пролиферативном заболевании. Конъюгатные соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) были созданы так, чтобы сшивающий агент каждого соединения катаболизировался внутри клетки, связанной посредством конъюгата. В таком качестве, доставка биологически активной молекулы при помощи конъюгата, описанного в примерах осуществления настоящего документа, дает возможность доставки биологически активных молекул которые, в обычных условиях, были бы слишком токсичными для обычного введения. Примеры осуществления настоящего документа, дают возможность высоко избирательной и специфической доставки этих молекул в клетки, испытывающие

рост идиобластов, или клетки, соучаствующие в пролиферативном заболевании (по сравнению с катаболизмом вне клетки, выпуская, посредством этого, биологически активное соединение в кровь или лимфатическую систему, например).

Как может быть предусмотрено специалистом, описанные в настоящем документе ковалентные конъюгатные соединения также могут использоваться для доставки любого типа полезных биологически активных молекул, и могут быть избирательно нацелены на любой тип клеточной популяции. Например, конъюгат может использоваться для доставки противоопухолевых лекарств к клеткам, переживающим патологический рост, или противовирусных препаратов к клеткам, инфицированным вирусом, пока выбранный лиганд распознает корректного партнера по связыванию клеток.

В данном свете, способы применения приводятся для описанных в настоящем документе примеров конъюгатных соединений.

Описанные в настоящем документе лекарственные препараты полезны для задержки, замедления и/или предотвращения роста идиобластов, или при лечении различных пролиферативных заболеваний или болезней у млекопитающих. В типичных примерах осуществления, млекопитающим является человек (описанные в настоящем документе примеры осуществления относятся к человеку). В число других млекопитающих входят любые млекопитающие, которые могут страдать от диагностируемых пролиферативных заболеваний, в том числе: приматы, собаки, кошки, лошади, козы, овцы, крупный рогатый скот, верблюды и им подобные. Кроме этого, известно, что конъюгатные соединения лекарственных средств предназначены для избирательного воздействия на клетки, переживающие рост идиобластов или лечения различных пролиферативных заболеваний или болезней, описанных в настоящем документе.

В связи с этим, описанные в настоящем документе примеры осуществления включают в себя методы задержки роста идиобластов или лечения пролиферативных заболеваний человека, включающие введение в организм человека терапевтически эффективного количества лекарственного средства, описанного в настоящем документе.

Введение описанного в настоящем документе терапевтически эффективного количества лекарственного средства может осуществляться несколькими путями, напр., путем внутривенного, внутривентриального, подкожного, внутримышечного, топического, внутрикожного, интраназального или эндобронхиального введения. Описанные в настоящем документе лекарственные средства также могут вводиться непосредственно в место роста идиобластов (прямо и косвенно соприкасаясь с ростом идиобластов) путем, например, библистической доставки (библистическая доставка описанных в настоящем документе лекарственных средств в легочную или мозговую опухоль, например). Рекомендуемая дозировка для введения описанных в настоящем документе лекарственных средств будет определяться лечащим врачом или другим специалистом этой области, а также основываться на конкретной клинической ситуации. Как известно специалистам в фармацевтике, дозировки для любого человека, т.е., пациента, зависят от нескольких факторов, в том числе от размеров пациента, площади тела пациента, его возраста и общего состояния здоровья, пола пациента, времени и способа введения, а также наличия второго лекарственного средства. В некоторых случаях, конъюгатные соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) могут присутствовать в количестве от 1 мкг до 100 мкг/кг массы тела на дозу (обратите внимание на то, что когда рассматривается способ введения путем непрерывной инфузии, может рассматриваться введение всего 1 мкг/кг массы тела в минуту). Фармацевтические композиции могут вводиться один или несколько раз в день и в течение нескольких дней, недель, месяцев или лет.

Лечение пролиферативной патологии или заболевания, например, опухоли, включает в себя методы уменьшения размера опухоли, вызывающие некроз или апоптоз в опухоли, цитолиз опухоли, остановку увеличения размера опухоли, и/или предотвращения инвазивности или метастаз опухоли.

Примеры состояний здоровья, которые могут быть вылечены в соответствии с методами задержки роста идиобластов, или лечения пролиферативных патологий, включают в себя: злокачественные опухоли любого типа, например рак легкого, толстой кишки, предстательной железы, почек, поджелудочной железы, печени, яичника, кожи, лимфома, лейкомия и т.п.; аутоиммунные заболевания, напр., системная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз; вирусные инфекции, напр., цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ инфекция, СПИД, гепатит, ВПЧ (вирус папилломы человека); боль; психические расстройства и воспалительное заболевания.

Как отмечалось выше, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также полезны при профилактике или лечении вирусных инфекций, болей, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний и т.п. у млекопитающих.

В одном варианте изобретения, приводится метод снижения, замедления или остановки роста идиобластов, состоящий из взаимодействия соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) с идиобластом в количестве, достаточном для замедления, снижения или остановки роста идиобласта, и при котором рост идиобластов замедляется, снижается или останавливается.

В одном варианте изобретения, приводится метод ликвидации клетки, состоящий из взаимодействия соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) с клеткой в количестве, достаточном для гибели клетки, и при котором клетка погибает.

В одном примере осуществления изобретения приводится метод ликвидации клетки, состоящий из

взаимодействия соединения формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) с клеткой в количестве, достаточном для гибели клетки, и при котором клетка погибает, и где клеткой является опухолевая клетка.

В одном варианте приводится метод лечения болезни у страдающего от болезни лица, состоящий из назначения этому лицу эффективного количества препарата, содержащего соединение формул [I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii).

В одном примере осуществления приводится метод лечения болезни у страдающего от болезни лица, состоящий из назначения этому лицу эффективного количества препарата, содержащего соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), и далее включающий последовательное назначение дополнительной терапии.

В одном примере осуществления приводятся методы, при которых дополнительной терапией является лучевая терапия, химиотерапия или сочетание обеих.

В одном примере осуществления приводится метод лечения болезни у страдающего от болезни лица, состоящий из назначения этому лицу эффективного количества препарата, содержащего соединение формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii), и далее включающий последовательное назначение дополнительной терапии, а также назначение как минимум одного дополнительного лекарственного препарата.

В одном варианте санируемое заболевание выбирается из опухолей, рака, инфекционных болезней, нейродегенеративных болезней, поражений костей и сердечно-сосудистых заболеваний.

В описанных в настоящем документе примерах осуществления также приводятся методы получения соединений формулы (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) из предшественника, или построения блочных соединений формул (II, IIa, IIb, IIc, IId). В некоторых вариантах, соединения формулы (II, IIa, IIb, IIc, IId) также могут применяться в терапевтических целях, где соединение формул (II, IIa, IIb, IIc, IId) является фармацевтической композицией.

Наконец, описанные в настоящем документе примеры осуществления могут включать в себя смеси соединений, как представлено формулами (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii) и (II, IIa, IIb, IIc, IId).

Получение конъюгатов

Конъюгатные соединения лиганд-биологически активная молекула могут формироваться с помощью любой известной специалистам технологии. Конъюгатные соединения лиганд-биологически активная молекула имеют элемент лиганда, биологически активную молекулу и, дополнительно, сшивающий агент, соединяющий биологически активную молекулу с лигандом. Ковалентное соединение биологически активных молекул и/или сшивающих агентов с лигандом может осуществляться с помощью множества реакций, использующих аминокислотные остатки лиганда, например антитело, включая аминокислоты лизина, свободные группы карбоновой кислоты глутаминовой и аспарагиновой кислот, сульфгидрильные группы цистеина и различные молекулы ароматических аминокислот.

Кроме того, конъюгаты в соответствии с описанными в настоящем документе примерами осуществления могут быть получены любым методом, известным специалистам. Пояснительный протокол получения конъюгатов приводится ниже в примерах. Тем не менее, могут использоваться и другие известные способы, включая, например, протоколы, описанные в публикации международной заявки WO 2009/134977, Патенте США US№7,811,572 и Патенте США US№6,441,163, пока они используются для получения соединений, описанных в настоящем документе. Эти справки включены посредством отсылки на их целевое назначение.

В одном примере осуществления конъюгаты могут быть получены путем i) реакции лиганда со сшивающим агентом для получения модифицированного соединения лиганд-Сшивающий агент; ii) необязательной очистки соединения лиганд-Сшивающий агент; iii) сопряжения биологически активной молекулы, например макролида, с лигандом-Сшивающим агентом для получения конъюгата формул (I, Ia, Ib, Ic, Id, Ii); и iv) очистки конъюгата.

В альтернативном примере осуществления конъюгаты могут быть получены путем реакции биологически активной молекулы с первым компонентом Сшивающего агента (Z_1), с последующими реакциями для построения Сшивающего агента.

В альтернативном примере осуществления, конъюгаты могут быть получены путем реакции лиганда, Сшивающего агента и биологически активного макролида в одной реакции. Сразу после получения, конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением могут быть очищены.

Определение цитотоксичности конъюгатных соединений

В одном примере осуществления, описанные в настоящем документе конъюгатные соединения могут оцениваться по их способности подавлять размножение различных линий раковых клеток вне организма. Анализы цитотоксичности вне организма могут производиться с помощью известных специалистам методов (см. Widdison и др., J. Med. Chem., 2006,49(14), 4392-408), и как показано в примере 7 настоящего документа. Например, конъюгатные соединения могут применяться вне организма к посеянному на чашке раковым клеткам в течение предустановленного числа дней, а выжившие клетки могут измеряться анализами с помощью известных методов. Для обеспечения действительности результатов, могут применяться надлежащие средства контроля, как могут значения IC_{50} . Примеры эффективности конъюгатных соединений настоящего документа вне организма можно увидеть на фиг. 1 и фиг. 2. Дополнительная эффективность в организме может использоваться для подтверждения эффективности предлагаемого конъюгатного соединения, например, используя модель "голой" мыши.

Приведенные выше формулировка, примеры и данные дают полное описание получения и использования состава настоящего изобретения. Так как многие примеры осуществления изобретения могут быть сделаны без отступления от существа и объема настоящего изобретения, изобретение заключается в приложенных далее по тексту формулах изобретения.

Все ссылки, процитированные в настоящем документе и последующих Примерах, явным образом полностью включены в данный документ посредством ссылок.

Представленные ниже описание и примеры сделаны для иллюстрации рассматриваемого изобретения. Специалисту будет понятно, что эти примеры приводятся только для наглядности, а не с целью ограничения данного изобретения.

Примеры

Подробности экспериментов.

Протонный спектры ЯМР (для соединений, которые невозможно обнаружить УФ-излучением) были получены с помощью оборудования "Varian Inova" 300 МГц, а массовые спектры были собраны на оборудовании масс-селективного детектора/жидкостной хроматографии "Agilent" серии 1100 с источником электрораспылительной ионизации и анализатором с тройной квадрупольной ионной ловушкой. Соответствующие конъюгаты были анализированы с помощью масс-спектрометра времяпролетной ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы "Bruker ultraFleXtreme". Все исходные материалы и растворители были приобретены на открытом рынке, и, если не указано иное, использовались без очистки.

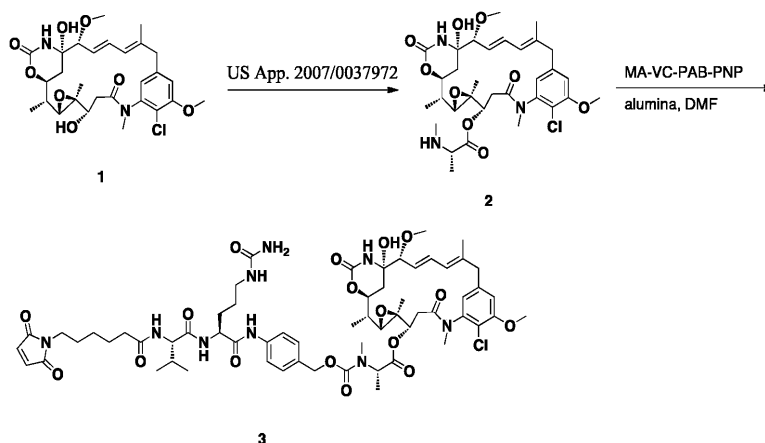
Пример 1.

Этап 1. Майтансин-3-N-метил-L-аланин (2).

Титульное соединение было получено как твердое вещество золотого цвета из майтансинола (1) с помощью методов, описанных в заявке на патент США US 2007/0037972 A1. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитан для $C_{32}H_{44}ClN_3O_9$, 649,3; полученный 650,6 (M+H).

Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-[4-(амино-цитруллин-валин-гексанамида-6-малеимидил)бензил]карбамат (3).

Продукт из предыдущего этапа (2, 0,020 г, 0,031 ммоль) и p-NO₂-Ph-карбоната-Bn-Cit-Val-малеимид (MA-VC-PAB-PNP, 0,027 г, 0,037 ммоль; компания "Concortis Biosystems") были растворены в N,N-диметилформамиде (DMF, ок. 0,25 мл) в конической пробирке, обработаны щелочным оксидом алюминия "Brockmann I" (0,10 г). Пробирка была прочищена аргоном, а реакция перемешивалась при комнатной температуре в течение 4 дней. После этого, смесь была отфильтрована, твердые частицы промыты смесью ацетонитрила с водой, а фильтрат очищен непосредственно в 5μ, 30×150 мм колонне "Phenomenex Gemini C18" через ЖХВД (30-90% ацетонитрила в воде, 0,1% трифторуксусной кислоты в обоих, в течение 25 мин, 15 мл/мин.). Лиофилизация химически чистой фракции на следующий день дала титульное соединение в виде бледно-желтого твердого вещества (0,021 г, 55%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{61}H_{82}ClN_9O_{17}$, 1247,6; получено 1248,8 (M+H), 1270,7 (M+Na), 1231,5 (M-H₂O+H).



Пример 2.

Этап 1. N-трет-Бутоксикарбонил-бета-аланин сукцинат эфир (4).

Титульное соединение было получено из имеющегося на рынке трет-бутоксикарбонил-бета-аланина с помощью метода, хорошо известного специалистам (для сравнения - Widdison и др., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): 8 3,62 (bm, 2H), 2,88 (m, 9H), 1,47 (s, 9H).

Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-трет-бутоксикарбонил-бета-аланин аминокислота (5).

Продукт из предыдущего этапа (4, 0,45 г, 1,51 ммоль) и майтансин-3-N-метил-L-аланин (2, 0,30 г, 0,23 ммоль) были растворены в смеси (3:1) ацетонитрила с водой (8 мл), обработанной 1M водного NaHCO₃ (0,5 мл), и перемешаны при комнатной температуре в течение 18 ч. Когда реакция была завершена тонкослойной хроматографией, она затем была перемешана с соляным раствором в течение 10 мин, и

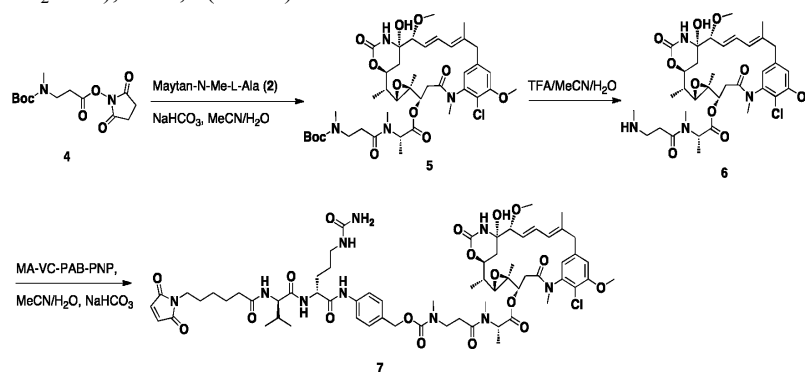
трижды экстрагирована с этилацетатом (EtOAc). После этого, объединенные органические слои были высушены на Na_2SO_4 , отфильтрованы, а фильтрат сконцентрирован и высушен в вакууме до состояния золотистого сиропа, который был очищен путем колоночной флэш-хроматографии на кассете с 20 г силикагеля (0-10% MeOH в этилацетате в течение 15 мин.), с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,084 г, 43%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{ClN}_4\text{O}_{12}$, 834,4; получено 835,2 (M+H), 857,2 (M+Na), 817,4 (M-H₂O+H).

Этап 3. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-бета-аланин аминокислота (6).

Продукт из предыдущего этапа (5, 0,080 г, 0,095 ммоль) был растворен в смеси (3:1:1) ацетонитрил/вода/трифторуксусная кислота (4 мл) и перемешан при комнатной температуре в течение 26 ч. Необработанная реакционная смесь была впрыснута непосредственно в колонну с 40 г силикагеля C18 и элюирована через систему очистки "ISCO CombiFlash" (10-90% ацетонитрила в воде, 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) в каждом растворителе, в течение 18 мин, 40 мл/мин), а объединенные химически чистые фракции были сублимированы для получения титульного соединения в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (0,025 г, 31%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитан для $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{ClN}_4\text{O}_{10}$, 734,3; получено 735,5 (M+H).

Этап 4. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-метил-N-[4-(аминоцитруллин-валин-гексанамид-6-малеимидил)бензил]карбамат (7).

Продукт из предыдущего этапа (6, 0,014 г, 0,019 ммоль) и МА-VC-РАВ-РNP (0,020 г, 0,027 ммоль; компания "Concortis Biosystems") были растворены в смеси (4:1) ацетонитрил/вода (2,5 мл), обработаны 0,1М водного NaHCO_3 (0,5 мл), и перемешаны при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакция была очищена напрямую с помощью хроматографии с обращенной фазой на силикагеле C18 (с применением 0,1% трифторуксусной кислоты в градиентах ацетонитрила/воды). Сублимационная сушка заключительных колонных фракций дала титульное соединение в виде твердого вещества белого цвета (0,002 г, 8%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{65}\text{H}_{89}\text{ClN}_{10}\text{O}_{18}$, 1332,6; получено 1333,9 (M+H), 1316,5 (M-H₂O+H), 1355,9 (M+Na).



Пример 3.

Этап 1. 3-Метилдигио пропионовой кислоты сукцинат эфир (8).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества белого цвета из 3-меркаптопропионовой кислоты с помощью методов Widdison и др. J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) 5,3,09 (m, 2H), 3,01 (m, 2H); 2,86 (s, 4H); 2,44 (s, 3H).

Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-метилдисульфид (9).

Продукт из предыдущего этапа (8, 2,96 г, 11,9 ммоль) и майтансин-3-N-метил-L-аланин (2, 1,54 г, 2,37 ммоль) были растворены в смеси (4:1) ацетонитрил/вода (25 мл), обработаны насыщенным водным NaHCO_3 (2 мл), и перемешаны при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционная смесь подверглась обработке солевым раствором, была трижды экстрагирована с этилацетатом, водный слой был насыщен NaCl , экстрагирован повторно с этилацетатом, а объединенные органические слои высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Фильтрат был сконцентрирован в вакууме до получения сиропа золотистого цвета (ок. 4,5 г), который был очищен путем колоночной флэш-хроматографии на кассете с 80 г силикагеля (0-100% этилацетата в гексанах в течение 30 мин), с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (1,14 г, 61%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}_2$, 783,3; получено 784,3 (M+H), 766,6 (M-H₂O+H).

Этап 3. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамид-3-тиол (10).

Титульное соединение было получено с помощью измененного метода, описанного Whitesides и др. (J. Org. Chem., 1991, 56, 2648-2650). Продукт из предыдущего этапа (9, 2,42 г, 3,09 ммоль) был растворен в ацетонитриле (30 мл), обработан раствором трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорида (8,23 г, 28,7 ммоль) в воде (30 мл), показатель кислотности pH был увеличен до 3 с добавлением насыщенного водного NaHCO_3 (5 мл), очищен в колбе с помощью аргона, и реакционная смесь перемешивалась при комнатной температуре под резиновой диафрагмой (вентилируемой вследствие бурного выделения газов). Через 2 ч, реакция была обработана солевым раствором (ок. 100 мл), газирована аргоном в течение 5 мин

(для удаления свободного метилмеркаптана), а фазы были разделены. Водная фаза была дважды экстрагирована с помощью этилацетата, насыщена NaCl, и еще дважды экстрагирована с помощью этилацетата. После этого, объединенные органические слои были высушены на Na_2SO_4 , отфильтрованы, а фильтрат сконцентрирован и высушен в вакууме для получения титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (2,24 г, 98%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}$, 737,3; получено 738,3 (M+H), 720,3 (M-H₂O+H).

Этап 4. 4-Амино-(N-бензилоксикарбонил)бензиламин (14).

4-Аминобензиламин (1,00 г, 8,18 ммоль) и триэтиламин (1,20 мл, 8,61 ммоль) были растворены в безводном тетрагидрофуране (THF, 10 мл) в атмосфере N_2 , охлаждены в соляно-ледяной ванне с перемешиванием, и капельно обработаны в течение 20 мин раствором бензил хлорформиата (1,20 мл, 8,41 ммоль) в безводном THF (10 мл). По завершению добавления, ледяная баня была удалена, и реакция перемешивалась при комнатной температуре в течение 20 ч, после чего фильтровалась через стеклокерамическую воронку для удаления нерастворимых веществ. Твердые вещества были промыты с помощью этилацетата, фильтрат был выпарен в вакууме, а осадок очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 40 г силикагеля (0-100% этилацетата в гексанах, в течение 20 мин, 40 мл/мин). Выпаривание химически чистых средних фракций в вакууме дало титульное соединение в виде бледно-желтого твердого вещества (1,47 г, 70%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, 256,1; получено 256,9 (M+H), 278,9 (M+Na).

Этап 5. 6-Малеимидикапроновой кислоты сукцинат эфир (20).

Титульное соединение было получено в виде бесцветной смолы из имеющейся на рынке 6-аминокапроновой кислоты методом, схожим с описанным Marnett и др. (J. Med. Chem., 1996, 39, 1692-1703). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) 6,72 (s, 2H); 3,56 (t, 2H, J = 7 Гц); 2,86 (s, 4H); 2,64 (t, 2H, J = 1 Гц); 1,81 (пентет, 2H, J = 8 Гц); 1,66 (m, 2H); 1,45 (m, 2H).

Этап 6. трет-Бутоксикарбонил-валин-сукцинат (11).

Титульное соединение было получено из трет-бутоксикарбонил-валина-ОН с помощью метода, хорошо известного специалистам (для сравнения - Widdison и др., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) 5,03 (d, 1H, J = 10 Гц); 4,60 (dd, 1H, J = 9 Гц, 5 Гц); 2,85 (s, 4H); 2,32 (m, 1H); 1,47 (s, 9H); 1,05 (m, 6H).

Этап 7. трет-Бутоксикарбонил-валин-цитруллин (12).

Продукт из предыдущего этапа (11,4,23 г, 13,5 ммоль) был растворен в ацетонитриле (70 мл), обработан раствором L-цитруллина (3,20 г, 18,3 ммоль) в воде (30 мл) и насыщенным раствором NaHCO_3 (18 мл), очищен в колбе с помощью N_2 , и реакция перемешивалась при комнатной температуре в течение 24 часов. Смесь была сконцентрирована в вакууме для удаления ацетонитрила, однократно промыта с этилацетатом для удаления неполярных загрязнений, а водный слой насыщен NaCl и подкислен до уровня pH 3 с помощью 10% HCl. Получившаяся непрозрачная смесь была четырежды экстрагирована с помощью 10% изопропанола в этилацетате, объединенные органические слои высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Концентрация и высушивание фильтрата в вакууме дали титульное соединение в виде твердого вещества желтого цвета (4,53 г, 90%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$, 374,2; получено 373,0 (M-H).

Этап 8. трет-Бутоксикарбонил-валин-цитруллин-амино-4-бензиламино-N-бензилоксикарбамат (15).

Продукт из предыдущего этапа (12,3,08 г, 8,23 ммоль) был растворен в N,N-диметилформамиде (DMF, 30 мл, высушен на молекулярных ситах), обработан дициклогексилкарбодиимидом (DCC, 2,31 г, 11,2 ммоль) и 1-гидроксibenзотриазол гидратом (HOBt, 1,51 г, 11,2 ммоль), колба продута N_2 и перемешан при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого, был добавлен раствор 4-амино-(N-бензилоксикарбонил)бензиламина (14,2,30 г, 8,97 ммоль) в DMF (15 мл), реакция перемешивалась еще 3 дня, была отфильтрована через стеклокерамическую воронку, а твердые вещества вымыты с помощью этилацетата. Фильтрат был промыт смесью (1:1) воды и насыщенного NaHCO_3 (100 мл), водный слой трижды экстрагирован с помощью 10% изопропанола/этилацетата, а органические слои промыты соевым раствором, высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Во время фильтрации образовался нерастворимый гель, который был растворен смесью метанола/этилацетата. Концентрация фильтрата в вакууме дала смолистый гель золотого цвета, который был обработан диэтиловым эфиром (50 мл), соникацией, отфильтрован и высушен разряжением для получения твердого вещества бледно-желтого цвета. Оно было очищено с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 330 г силикагеля (0-10% метанола в дихлорметане, 100 мл/мин) с получением титульного соединения в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (4,07 г, 81%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_7$, 612,3; получено 613,4 (M+H).

Этап 9. трет-Бутоксикарбонил-валин-цитруллин-амино-4-бензиламин (16).

Продукт из предыдущего этапа (15,3,04 г, 4,96 ммоль) и 10% палладий (0) на активированном угле (0,286 г, 0,269 ммоль) были обработаны в атмосфере N_2 метанолом (50 мл) и ледяной уксусной кислотой (0,57 мл, 9,95 ммоль). Реакция газировалась несколько минут с помощью N_2 и водорода, и активно перемешивалась под водородным давлением при комнатной температуре и давлении в течение 1 ч. По завершении реакции с тонкослойной хроматографией, баллон был удален, суспензия газировалась несколько

минут с помощью N_2 , и далее на фильтрующем агенте "Celite 521". Фильтрующий агент "Celite" был промыт метанолом, фильтрат выпарен насухо в вакууме, а остаток однократно растерт в порошок с диэтиловым эфиром, и высушен в вакууме, с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (2,95 г, 99%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{23}H_{38}N_6O_5$, 478,3; получено 479,2 (M+H).

Этап 10. трет-Бутоксикарбонил-валин-цитруллин-амино-4-бензилизотиоцианат (17).

Продукт из предыдущего этапа (16, 0,586 г, 0,979 ммоль) был растворен в сухом тетрагидрофуране (20 мл) и сухом N,N-диметилформамиде (5 мл) в атмосфере N_2 , обработан триэтиламино (0,40 мл, 2,87 ммоль), охлажден в ледяной бане, и капельно обработан сероуглеродом (0,10 мл, 1,66 ммоль) в течение 5 мин. Реакция была подогрета до комнатной температуры и перемешана в течение 2 ч, снова охлаждена во льду, и обработана p-толуолсульфонил хлоридом (0,281 г, 1,47 ммоль). После нагрева до комнатной температуры и перемешивания в течение 18 ч, реакция была промыта смесью (1:1) воды/соляного раствора, дважды экстрагирована этилацетатом, водный слой был насыщен NaCl, еще дважды экстрагирована этилацетатом, а объединенные органические слои были промыты соевым раствором, высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Выпаренный фильтрат был очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 20 г силикагеля (0-100% ацетонитрила в этилацетате, 35 мл/мин), с получением титульного соединения в виде твердого вещества золотого цвета (0,391 г, 77%) после азеотропии с дихлорметаном и высушивания под глубоким вакуумом. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{24}H_{36}N_6O_5S$, 520,3; получено 521,1 (M+H).

Этап 11. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-метил-N-[4-(аминоцитруллин-трет-бутоксикарбонил-валин)бензил]дитиокарбамат (18).

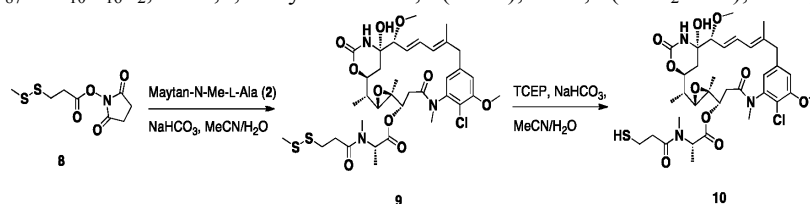
Продукт из предыдущего этапа (17, 0,068 г, 0,131 ммоль) и майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамид-3-тиол (10, 0,048 г, 0,065 ммоль) были растворены в безводном THF (3 мл) в атмосфере аргона, обработаны триэтиламино (0,050 мл, 0,359 ммоль) через шприц, и перемешивались при комнатной температуре под резиновой диафрагмой в течение 18 ч. Реакция была концентрирована в вакууме, растворена в 10% изопропанола/этилцетате, и промыта с помощью 0,5N водной HCl. Водный слой был трижды экстрагирован с помощью 10% изопропанола/этилцетата, объединенные органические слои были промыты соевым раствором, высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Выпаренный фильтрат был очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 12 г силикагеля (0-20% метанола в этилацетате, 30 мл/мин) с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,042 г, 51%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{59}H_{84}ClN_9O_{15}S_2$, 1257,5; получено 1258,8 (M+H), 1241,5 (M-H₂O+H), 1280,6 (M+Na).

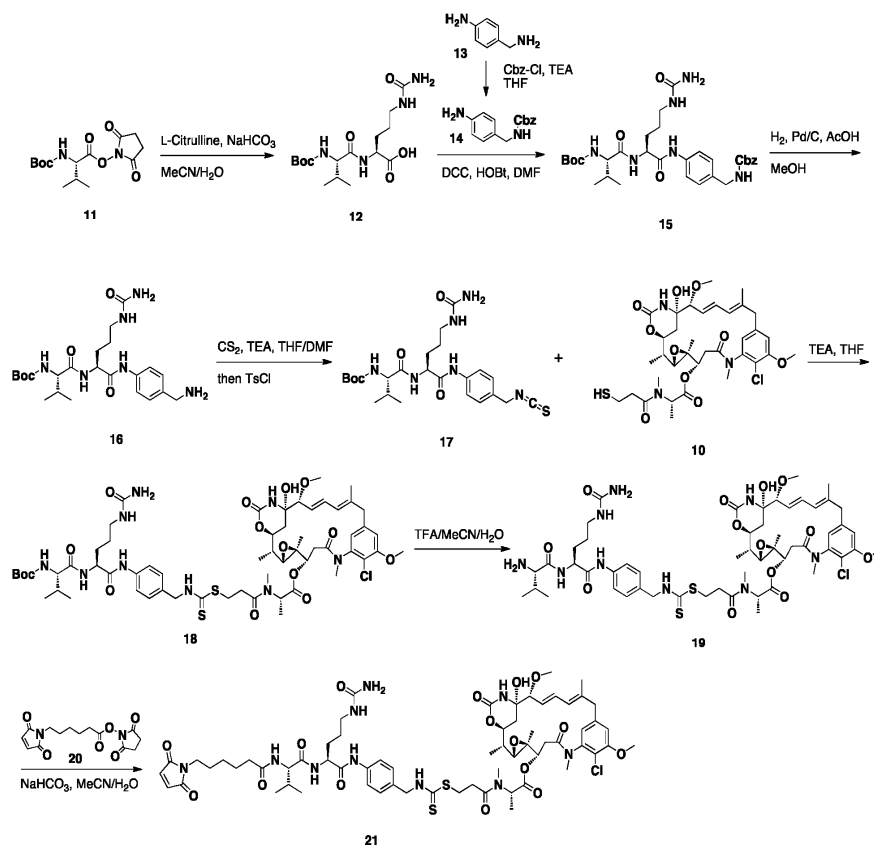
Этап 12. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-[4-(амино-цитруллин-валин)бензил]дитиокарбамат (19).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества золотистого цвета (0,016 г, 100%) из продукта предыдущего этапа (18, 0,014 г, 0,011 ммоль) методом из примера 2, этап 3 (соединение 6). Соединение использовалось без дополнительной очистки. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{54}H_{76}ClN_9O_{13}S_2$, 1157,5; получено 1159,4 (M+H).

Этап 13. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-[4-(амино-цитруллин-валин-гексамид-6-малеимидил)бензил]дитиокарбамат (21).

Продукт из предыдущего этапа (19, 0,055 г, 0,032 ммоль) был растворен в смеси (1:1) ацетонитрил/вода (4 мл), обработан 1N водной $NaHCO_3$ (0,5 мл) и раствором 6-малеимидилкапроновой кислоты сукцинат эфира (20, 0,070 г, 2,27 ммоль) в ацетонитриле (6 мл), и очищен в колбе аргоном под резиновой диафрагмой. После перемешивания реакции при комнатной температуре в течение 5 ч, перед последующим нагреванием до комнатной температуры и растворения соевым раствором, она была оставлена на 3 дня при температуре в $-20^\circ C$. Смесь была трижды экстрагирована этилацетатом, объединенные органические слои были промыты соевым раствором, высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. Выпаренный фильтрат был очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 12 г силикагеля (0-20% метанола в этилацетате, в течение 18 мин, 25 мл/мин) с получением титульного соединения в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (0,011 г, 26%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{64}H_{87}ClN_{10}O_{16}S_2$, 1350,5; получено 1352,0 (M+H), 1334,5 (M-H₂O+H), 1373,5 (M+Na).





Пример 4.

Этап 1. N-(4-Аминометилфенил)ацетамид гидрохлорид (23).

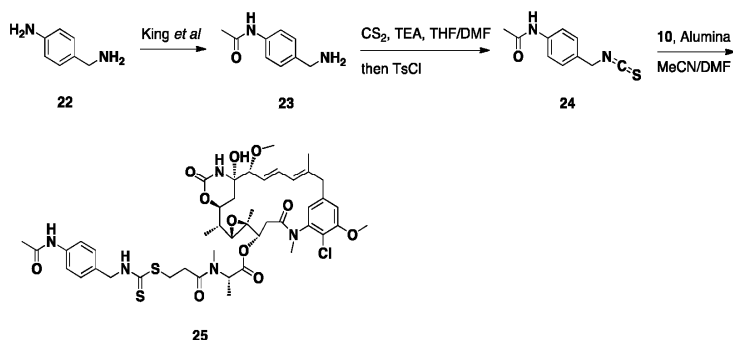
Титульное соединение было получено в виде твердого вещества светло-желтого цвета из 4-аминобензиламина с помощью метода King и др. (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114 (8), 3033), ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆): 8,10,18 (s, 1H); 8,36 (br s, 3H); 7,63 (d, 2H, J = 8,7 Гц); 7,41 (d, 2H, J = 8,7 Гц); 3,95 (s, 2H); 2,06 (s, 3H).

Этап 2. N-(4-Изотиоцианатометилфенил)ацетамид (24).

Продукт из предыдущего этапа (23, 0,277 г, 1,38 ммоль) был растворен в THF (4,5 мл) и DMF (2,0 мл), охлажден в ледяной бане в атмосфере N₂, обработан триэтиламино (0,66 мл, 4,73 ммоль), после чего капельно обработан сероуглеродом (0,125 мл, 2,07 ммоль). Реакция была подогрета до комнатной температуры, перемешивалась в течение 3 ч, после чего снова охлаждена во льду. После обработки p-толуолсульфонил хлоридом (0,274 г, 1,45 ммоль), реакция была медленно подогрета до комнатной температуры с одновременным перемешиванием в течение 18 ч. Смесь была разбавлена водой, подкислена до pH 2 с помощью 10% водной HCl, и трижды экстрагирована с этилацетатом. Объединенные органические слои были промыты солевым раствором, высушены на Na₂SO₄, и отфильтрованы. Выпаренный фильтрат был очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 20 г силикагеля (0-50% ацетонитрила в этилацетате, в течение 20 мин, 30 мл/мин) с получением титульного соединения в виде твердого вещества кремового цвета (0,157 г, 55%). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,55 (d, 2H, J = 8,7 Гц); 7,29 (m, 3H); 4,70 (s, 2H); 2,23 (s, 3H).

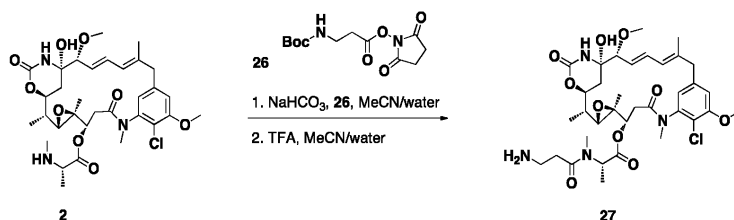
Этап 3. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-[4-(ацетамидил)бензил]дитиокарбамат (25).

Продукт из предыдущего этапа (24, 0,093 г, 0,45 ммоль) и продукт из примера 3, Этап 3 (10, 0,070 г, 0,095 ммоль) были растворены в ацетонитриле (MeCN, 2 мл) и безводном DMF (1 мл), и обработаны щелочным оксидом алюминия (активированным, Brockmann I, 0,357 г). После продувки колбы аргонem, реакция перемешивалась при комнатной температуре в течение 2 дней, была отфильтрована, а твердые вещества промыты метанолом/ацетонитрилом. Выпаренный фильтрат был очищен с помощью колоночной флэш-хроматографии на колонне с 12 г силикагеля (0-50% ацетонитрила в этилацетате, в течение 15 мин, 25 мл/мин), а более медленные фракции продукта были сконцентрированы в вакууме до неочищенной смолы бледно-желтого цвета. Она была очищена путем обращено-фазовой высоко эффективной жидкостной хроматографии (Phenomenex Gemini C18, колонна 30×150 мм, 30-90% ацетонитрила в воде, 0,1% трифторуксусной кислоты в обоих веществах), а чистые фракции были сублимированы с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,016 г, 18%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для C₄₅H₅₈ClN₅O₁₁S₂, 943,3; получено 944,7 (M+H), 927,1 (M-H₂O+H), 966,6 (M+Na).



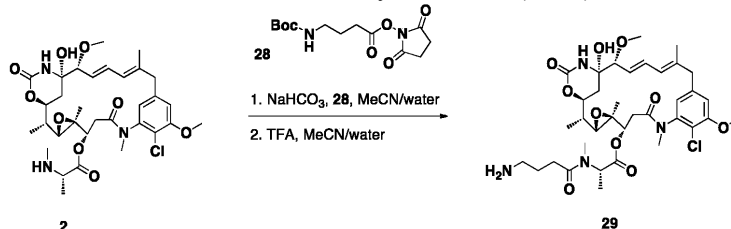
Пример 5. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-бета-аланин (27).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества бледно-желтого цвета из 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропаноат (26) методом из примера 2, этапы 1-3. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{35}H_{49}ClN_4O_{10}$, 720,3; получено 721,4 (M+H).



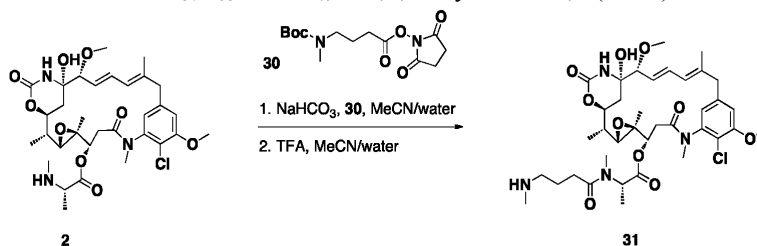
Пример 6. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-гамма-аминобутирамид (29).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества бледно-желтого цвета из N-трет-бутоксикарбонил-ОАВ А-ОН (28) методом из примера 2, этапы 1-3. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$, 734,3; получено 735,5 (M+H).



Пример 7. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-Ме-гамма-аминобутирамид (31).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества бледно-желтого цвета из N-трет-бутоксикарбонил-N-Ме ГАВА-ОН (30) методом из примера 2, этапы 1-3. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{37}H_{53}ClN_4O_{10}$, 748,4; получено 749,5 (M+H).



Пример 8.

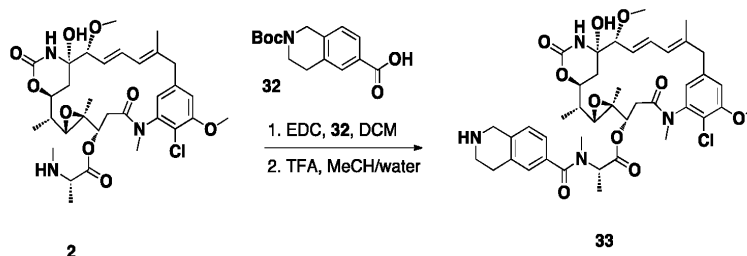
Этап 1. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-карбокси-6-[3,4-дигидро-2-(трет-бутоксикарбонил)-1H-изохинолин].

Майтан-3-N-метил-L-(S)-аланин (2, 0,034 г, 0,052 ммоль), техническая N-трет-бутоксикарбонил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-карбоновая кислота (32, 0,019 г, 0,069 ммоль), и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC, 0,024 г, 0,125 ммоль) были взвешены в круглодонной лабораторной колбе с магнитным мешальником, растворены в дихлорметане (3 мл), колба продута аргонном и запечатана резиновой диафрагмой. Реакция перемешивалась при комнатной температуре. Через 2 дня реакция была разбавлена этилацетатом, и промыта раствором водного $NaHCO_3$, а водный слой был дважды экстрагирован этилацетатом. Объединенные органические слои были промыты солевым раствором, высушены на Na_2SO_4 , и отфильтрованы. После этого, выпаренный фильтрат был очищен на колонне с 12 г силикагеля "RediSep Gold" через систему "ISCO" (этилацетат- 5:5:1 этилацетат/дихлорметан/MeOH в течение 12 мин, 30 мл/мин), а объединенные, чистые по тонкослойной хроматографии, фракции были

выпарены и высушены в вакууме с получением титульного соединения в виде твердого вещества палевого цвета (0,026 г, 55%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{47}H_{61}ClN_4O_{12}$, 908,4; получено 909,2 (M+H), 891,2 (M-H₂O+H).

Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-карбокси-6-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин) (33).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества золотистого цвета (0,013 г, 52%) из продукта предыдущего этапа (0,025 г, 0,027 ммоль) методом из примера 2, этап 3 (соединение 6). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{42}H_{53}ClN_4O_{10}$, 808,3; получено 809,2 (M+H).

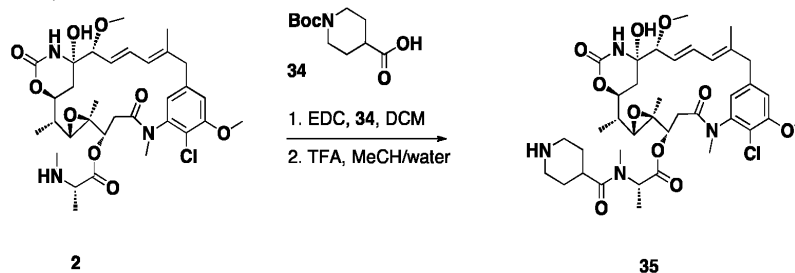


Пример 9. Этап 1. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-карбокси-4-[1-(трет-бутоксикарбонил)-пиперидин].

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества белого цвета (0,027 г, 46%) из майтан-3-N-метил-L-(S)-аланина (2, 0,045 г, 0,069 ммоль) и технического 1-т-бутоксикарбонилпиперидина-4-карбоновая кислоты (34, 0,024 г, 0,105 ммоль) методом из примера 8, этап 1. МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{43}H_{61}ClN_4O_{12}$, 860,4; получено 861,2 (M+H), 843,2 (M-H₂O+H).

Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-карбокси-4-пиперидин (35).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества золотистого цвета (0,012 г, 50%) из продукта предыдущего этапа (0,025 г, 0,029 ммоль) методом из примера 2, этап 3 (соединение 6). Соединение было очищено на колонне C18 с использованием другого градиента и модификатора (20-80% MeCN в воде, 0,05% уксусной кислоты в обоих). Лиофилизация чистых фракций дала титульное соединение (0,008 г, 35%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{38}H_{53}ClN_4O_{10}$, 760,3; получено 761,2 (M+H).



Пример 10.

Этап 1. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-метил-бета-аланин-N-[4-(трет-бутоксикарбонил-валин-цитруллин-амино)бензилокси]карбамат.

Трет-бутоксикарбонил-валин-цитруллин-р-аминобензилокси-(р-нитрофенилокси)карбонат (36), полученный в соответствии с публикацией международной заявки WO2005112919, (0,092 г, 0,143 ммоль), продукт из примера 2, Этап 3 (6, 0,110 г, 0,130 ммоль), и 1-гидрокси-7-азабензотриазол (НОАТ, 0,037 г, 0,272 ммоль) были растворены в DMF (7 мл), обработаны метиламином (0,100 мл, 0,717 ммоль), и перемешаны при комнатной температуре в колбе с пробкой. Через 18 ч, реакционная смесь была сконцентрирована в вакууме до состояния масла, растворена в дихлорметане, и очищена на 24 г колонным "RediSep Gold" через "ISCO Combiflash" (0-20% метанола в этилацетате).

После этого, выпаривание фракций продукта в вакууме дало титульное соединение в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (0,129 г, 80%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{60}H_{86}ClN_9O_{17}$, 1239,6; получено 1240,8 (M+H).

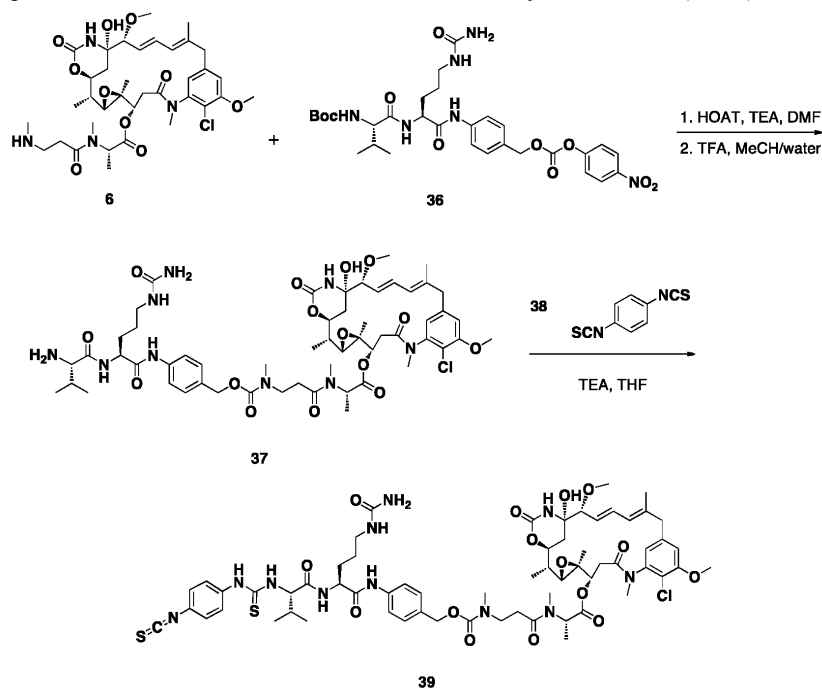
Этап 2. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-метил-бета-аланин-N-[4-(валин-цитруллин-амино)бензилокси]карбамат (37).

Титульное соединение было получено в виде твердого вещества белого цвета (0,074 г, 63%) из продукта предыдущего этапа (0,128 г, 0,103 ммоль) методом из примера 2, этап 3 (соединение 6). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{55}H_{78}ClN_9O_{15}$, 1139,5; получено 1141,4 (M+H).

Этап 3. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-метил-бета-аланин-N-[4-(4-{изотиоцианатофенил}тиоуреидо-валин-цитруллин-амино)бензилокси]карбамат (39).

Продукт из предыдущего этапа (37, 0,037 г, 0,029 ммоль) был растворен в тетрагидрофуране (THF, 5 мл) в пробирке, обработан триэтиламином (0,020 мл, 0,143 ммоль), а получившийся раствор был капельно добавлен в колбу, содержащую перемешанный раствор 1,4-фенилендиизотиоцианата (38, 0,055 г, 0,286 ммоль) в THF (10 мл) в течение 15 мин. Пробирка была промыта THF (2 мл), и раствор был добав-

лен в реакционную колбу, которая была закрыта резиновой диафрагмой. После перемешивания при комнатной температуре в течение 24 ч, реакция была сконцентрирована в вакууме до осушения, неочищенный продукт растворен в ацетонитриле, и отфильтрован через тefлоновую мембрану с размером ячейки в 0,45 мкм. После этого, фильтрат был очищен на 30 г колонны C18 "RediSep Gold" через "ISCO" (20-80% MeCN в воде, 0,05% HOAc в обоих растворителях), а химически чистые фракции (по жидкостной хроматографии) объединены, заморожены при температуре 78°C, и лиофилизованы с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,023 г, 59%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для C₆₃H₈₂ClN₁₁O₁₅S₂, 1331,5; получено 1332,0 (M+H).



Пример 11.

Этап 1. 1-(4-Аминобутил)малеимид.

Раствор технического трет-бутоксикарбонил-1-аминобутил-4-малеимида (0,304 г, 1,13 ммоль) в дихлорметане (10 мл) был обработан трифторуксусной кислотой (1,00 мл, 13,1 ммоль), колба продута аргоном, запечатана резиновой диафрагмой и воздуховодом, и перемешивалась при комнатной температуре. Через 18 ч реакция завершилась тонкослойной хроматографией, поэтому она была концентрирована в вакууме, дважды растерта в порошок с диэтиловым эфиром, и высушена в вакууме до состояния смолы.

Смола была еще дважды растерта в порошок с эфиром (с одновременным выскабливанием шпателем), осажена, и снова высушена в вакууме с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,321 г, 100%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для C₈H₁₂N₂O₂, 168,1; получено 169,0 (M+H).

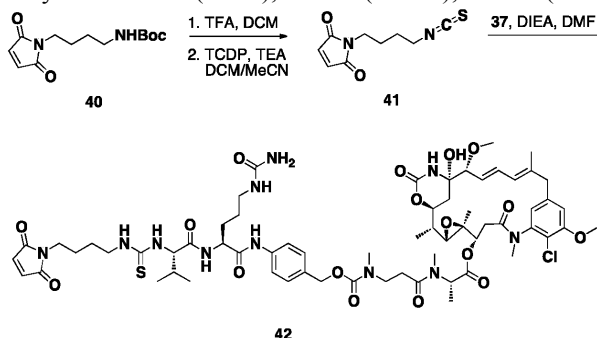
Этап 2. 1-(4-Изотиоцианатобутил)малеимид (41).

Продукт из предыдущего этапа был растворен в ацетонитриле (MeCN, 3×40 мл) и концентрирован в вакууме при 60°C с помощью ротационного испарителя. Высушенный продукт (0,650 г, 2,45 ммоль) был растворен в MeCN (75 мл) и хлороформе (30 мл) в колбе, обработан триэтиламино (1,0 мл, 7,35 ммоль), а полученный раствор был капельно добавлен в колбу, содержащую 1,1'-тиокарбонилди-2,2'-пиридон (0,68 г, 2,94 ммоль) в хлороформе (25 мл) в атмосфере азота в течение 10 мин. Реакция перемешивалась при комнатной температуре в течение 18 ч, концентрирована в вакууме до осушения. Неочищенный продукт был растворен в дихлорметане (DCM) и очищен на колонне с 120 г силикагеля "RediSep Gold" путем колонной флэш-хроматографии (0-10% MeOH в DCM). Технически чистые фракции (по LC) были объединены и концентрированы до осушения с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,26 г, 50%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для C₉H₁₀N₂O₂S, 210,0; получено 211,2 (M+H).

Этап 3. Майтансин-3-N-метил-L-(S)-аланин-N-метил-β-аланин-N-[4-(4-{малеимидилбутил} тиоуреидо-валин-цитруллин-амино)бензилокси]карбамат (42).

Продукт из примера 10, Этап 2 (37, 0,029 г, 0,023 ммоль) был растворен в безводном DMF (2 мл), обработан диизопропилэтиламино (0,020 мл, 0,115 ммоль) с помощью сухого шприца, после чего раствором продукта из предыдущего этапа (41, 0,026 г, 0,124 ммоль) в сухом DMF (2 мл). Реакционная колба была продута аргоном, закрыта резиновой диафрагмой, а реакция перемешана при комнатной температуре. Через 18 ч реакция оказалась на 80% завершённой с помощью жидкостной хромато-масс спектрометрии, поэтому она была выпарена в вакууме, до состояния масла, растворена в смеси MeCN/вода, и

очищена на колонне с 30 г C18 "RediSep Gold" с помощью колоночной флэш-хроматографии (20-80% MeCN в воде, 0,05% HOAc в обоих растворителях). Химически чистые (по жидкостной хромато масс-спектрометрии) фракции были объединены, быстро выпарены ротационным способом, заморожены на сухом льду, и лиофилизованы за ночь с получением титульного соединения в виде твердого вещества белого цвета (0,020 г, 65%). МС (электрораспылительная ионизация, поз.): рассчитано для $C_{64}H_{88}N_{11}O_{17}SCl$, 1349,6; получено 1351.1 (M+H), 1372.9 (M+Na), 1333.6 (M-H₂O+H).



Пример 12. Получение конъюгата и определение характеристик.

Для начальной серии опытов, с помощью описанной ниже процедуры, четыре антитела были сопряжены с различными соединениями сшивающего агента с лекарственным препаратом настоящего раскрытия. Четырьмя антителами, использованными в этих экспериментах, были:

(1) антитело PSMA (простатический специфический мембранный антиген), имеющее тяжелые и легкие цепные переменные домены клона AB-PG1-XG1-006, как указано в публикации международной заявки WO 2007002222A2,

(2) антитело STEAP1 (Шесть трансмембранных эпителиальных антигенов простаты 1), имеющее тяжелые и легкие цепные переменные домены клона mu120, выраженное в виде "hIgG1", как указано в публикации международной заявки WO 2008052187A2,

(3) антитело "EGFRvIII", имеющее тяжелые и легкие цепные переменные домены клона 131, как указано в публикации международной заявки WO 2013075048A1, и

(4) PRLR (рецептор пролактина), имеющее тяжелые и легкие цепные переменные домены клона H1N6953N, как указано в публикации заявки США с серийным номером 61/868,185; зарегистрированной 21 августа 2013 г. (раскрытие которой настоящим включено путем отсылки полностью). Все моноклональные антитела были выражены в виде клеток яичника китайского хомячка (CHO), и очищены белком А. Также использован не имеющий обязательной силы контроль, полученный иммунологического антигена, не имеющего отношения к онкологии.

Метод конъюгации для соединений 3, 7, 21 и 42.

Антитело (10 мг/мл) в 50 mM ГЭПЭС (HEPES), 150 mM NaCl, pH 7,5, было обработано 1 mM дитиотреитолом при 37°C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 4,5 ацетат натрия), к ослабленному антителу и смеси, доведенной до pH 7,0 с помощью 1 M ГЭПЭС (pH 7,4) было добавлено производное полезной нагрузки малеимидного сшивающего агента (1,2 эквивалента/группа инокуляционного гепатита) в ДМСО (DMSO) (10 мг/мл).

Через 1 ч, реакция была резко охлаждена с помощью избыточного N-этил малеимида. Конъюгаты были очищены путем эксклюзионной хроматографии и стерильно отфильтрованы. Концентрации белка и полезной нагрузки сшивающего агента были определены с помощью ультрафиолетового спектрального анализа. Эксклюзионная ЖХВД установила, что все использованные конъюгаты были более чем на 95% мономерными, а обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография установила наличие менее чем 0,5% неконъюгированной полезной нагрузки сшивающего агента. Результаты приводятся в табл. 1 на основе белка. Все конъюгированные антитела были анализированы с помощью ультрафиолета на значения загруженности полезной нагрузки сшивающего агента в соответствии с Hamblett и др., Cancer Res., 2004 10 7063. Результаты обобщены в табл. 1.

Метод конъюгации для соединения 39.

К антителу (2-5 мг/мл) в 50 mM карбоната, 150 mM NaCl, pH 9,0, было добавлено 15% по объему диметилацетамида. К антителу было добавлено производное полезной нагрузки сшивающего агента 39 (5-10 эквивалентов) в ДМСО (10 мг/мл), и смесь инкубировалась при 37°C в течение 4-12 ч. Конъюгаты были очищены путем эксклюзионной хроматографии и стерильно отфильтрованы. Концентрации белка и полезной нагрузки сшивающего агента были определены с помощью ультрафиолетового спектрального анализа. Эксклюзионная ЖХВД установила, что все использованные конъюгаты были более чем на 95% мономерными, а обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография установила наличие менее чем 0,5% неконъюгированной полезной нагрузки сшивающего агента. Для этих конъюгатов, отношение полезной нагрузки к антителу было установлено с помощью времяпролетной ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы (табл. 1).

Таблица 1

Соединение	$\epsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$
3	32000	8500
7	50600	8100
21	44190	9460
39	--	--

Антитело	$\epsilon_{252 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ нм}} (\text{см}^{-1} \text{ М}^{-1})$
STEAP1	87939	244276
PSMA	77652	224320
PRLR	80673	220420
EGFRvIII	79579	209420
Изотипический контроль	75113	218360

Конъюгат антитела	Полезная нагрузка: Антитело (УФ)	Выход, %
STEAP1-7	1.4	36
PSMA-3	3.5	44
PSMA-7	3.4	60
PSMA-21	0.9	45
PRLR-7	3.0	70
EGFRvIII-7	3.4	64
EGFRvIII-39	1.3 (МАЛДИ)	40
Изотипический контроль -3	3.0	48
Изотипический контроль -7	2.3	51
Изотипический контроль -21	2.3	45
Изотипический контроль -39	1.1 (МАЛДИ)	40

Пример 13.

Бесклеточный ферментный анализ конъюгат антитела-лекарственного препарата (ADC) вне организма.

Инкубация Катепсина В.

Процедура бесклеточного ферментного анализа вне организма была принята от Dubowchik, и др., Bioconjugate Chem. 2002 13 855. Скорректированная коэффициентом абсорбции концентрация PRLR-7 и Изотипического контроля-7 была задана как 7,00 мкМ в 25 мМ буфере ацетата натрия, 1 мМ ЭДТК (EDTA), pH 5,0 и предварительно инкубирована при 37°C. Катепсин В (Sigma #C8571) был активирован при комнатной температуре в течение 15 мин с 1 эквивалентом 30 мМ ДТТ (DTT), 15 мМ ЭДТК на 2 эквивалента исходного раствора Катепсина В. Активированный раствор Катепсина В был добавлен к растворам конъюгатов антитела с лекарственным препаратом в молярном отношении 1:750. Образцы были инкубированы при 37°C в течение 24 ч и аликвотированы либо для выявления путем ЖХВД (HISEP)-УФ, или для выявления путем жидкостной хроматографии масс-спектрометрии, см. ниже.

Выявление путем жидкостной хромато масс-спектрометрии.

В установленные моменты времени, небольшая аликвота вынималась, и сравнивалась с 2 объемными эквивалентами холодного метанола. Супернатант восстанавливался, и анализировался с помощью жидкостной хроматографии масс-спектрометрии для расщепления произведенного соединения 6 полезной нагрузки сшивающего агента Катепсина В с помощью колонны "Merck Chromolith FastGradient RP-18e", 2×50 мм, от 10 до 90% MeCN в течение 5 минут, в H₂O с 0,05% HOAc в обоих растворителях и расходом в 1 мл. Профиль элюции наблюдался при длине волны в 254 нм. Все аликвоты, инкубированные при 37°C с Катепсином В, содержали соединение 6, элюировавшее в 5,1 минуты с массой в 735 М+Н (рассчитано для C₃₆H₅₁ClN₄O₁₀, 734,3), и ни одна из аликвот без Катепсина В не содержала соединения 6. Это также было подтверждено инъекцией чистого соединения 6 из примера 2, этап 3.

Выявление путем ЖХВД (HISEP)-УФ.

Растворы впрыскивались без изменений в установленные моменты времени. Использовался следующий градиентный метод: буфер "А", 100% 100 мМ NH₄OAc, pH 7,0 и буфер "В", 100% ацетонитрил, скорость потока 0,4 мл/мин., от 5 до 70% буфера "В", в колонне ЖХ "Supelco HISEP"; 150 мм × 4,6 мм. Профиль элюции наблюдался при длине волны в 280 нм и 252 нм. Все аликвоты конъюгатов антитела с лекарственным препаратом, инкубированные с Катепсином В, содержали продукты, которые элюировали через 19,4 минуты. В идентичных условиях градиента, чистое соединение 6 элюирует с таким же временем удержания. Образцы со временем в 19,4 минуты отсутствовали в аликвотах без Катепсина В.

Результаты данного примера являются важными в некоторой степени, так как протеолиз Катепсина В в 6 должен происходить только после интернализации конъюгата антитела с лекарственным препаратом в клетке, в которой имеются ферменты. Нецелевые результаты должны быть уменьшены, так как антитело доставляет цитотоксичную полезную нагрузку напрямую в адресные клетки.

Пример 14. Реакции цитотоксичности вне организма.

В данном примере была произведена оценка способности различных конъюгатов антитела с лекар-

ственным препаратом к уничтожению антиген отжимающих опухолевых клеток вне организма.

Клетки были посеяны в 96-луночные плашки с поли-D-лизиновым покрытием в количестве 375 (MMT/hEGFRvIII), 1500 (U251/hEGFRvIII), 2000 (HEK293/hEGFRvIII) или 3000 (C4-2, PC3/hSTEAP1, T47D и U87-MG) клеток на плашку в комплексную среду для роста, и выращивались за один день. Для кривых жизнеспособности клетки, к клеткам добавлялись последовательно разбавленные конъюгаты или свободно репрезентативные полезные нагрузки в конечной концентрации в диапазоне от 500 нМ до 1 пМ, и инкубировались в течение 3 суток. Для измерения жизнеспособности в MMT/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII, HEK293/hEGFRvIII, C4-2, PC3/hSTEAP1 и U87-MG, клетки инкубировались с холецистокинин октапептидом CCK8 ("Dojindo") в течение последних 1-3 ч, а поглощение при длине волны в 450 нм (OD450) было определено с помощью спектрофотометра "Flexstation 3" (компания "Molecular Devices"). Для измерения жизнеспособности в T47D, клетки инкубировались на льду в течение 30 мин в 4% формальдегид + 3 мкг/мл хехста. Изображения окрашенных хехстом ядер были получены системой "ImageXpress Micro XL" (компания "Molecular Devices"), а число ядер было определено с помощью аналитического ПО "Columbus" (компания "PerkinElmer"). Фоновые уровни OD450 (CCK8) или число ядер от дигитонина (40 нМ) обработанных клеток были вычтены из всех плашек и жизнеспособность была выражена как процент от необработанных контрольных образцов. Значения IC_{50} были установлены на основе четырех-параметрического логистического уравнения на 10-точечной характеристической кривой (ПО "GraphPad Prism"). Все кривые и значения IC_{50} были скорректированы на эквиваленты полезной нагрузки.

В клетках C4-2 (линия рака предстательной железы), по умолчанию выражающих PSMA при 271 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидные конъюгаты PSMA-3, PSMA-7 и PSMA-21 имеют значения IC_{50} равные 3.8; 0.5 и 8.3 нМ соответственно (фиг. 1). Голое антитело PSMA было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

В клетках PC3/hSTEAP1 (линия рака предстательной железы), выражающих hSTEAP1 при 352 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидный конъюгат STEAP1-7 имеет значение IC_{50} в 4 нМ (фиг. 2). Голое антитело STEAP1 было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

В клетках T47D (линия рака молочной железы), по умолчанию выражающих PRLR при 14 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидный конъюгат PRLR-7 имеет значение IC_{50} в 1,0 нМ (фиг. 3). Голое антитело T47D было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

В клетках HEK293/hEGFRvIII, выражающих hEGFRvIII при 360 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидный конъюгат EGFRvIII-7 имеет значение IC_{50} в 0,4 нМ (фиг. 4). Голое антитело EGFRvIII было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

В клетках MMT/hEGFRvIII, выражающих hEGFRvIII при 280 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидный конъюгат EGFRvIII-7 имеет значение IC_{50} в 0,3 нМ (фиг. 5). Голое антитело EGFRvIII было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

В клетках U251/hEGFRvIII (линия глиобластомы), выражающих hEGFRvIII при 165 кратности выше фиксации изотипического контроля, майтанзиноидный конъюгат hEGFRvIII-7 имеет значение IC_{50} в 0.3 нМ (фиг. 6). Голое антитело EGFRvIII было лишено какой-либо антипролиферативной активности.

Вне организма цитотоксичность предположительно выпускаемых полезных нагрузок ("лекарственные вещества, не связанные с белками плазмы крови") была также проверена в описанных выше различных клеточных линиях, и нанесена вдоль конъюгированных антител для сравнения (см. замкнутые квадраты (■) на фиг. 1-6). Для полезных нагрузок сшивающих агентов 3 и 7, предлагаемые выпускаемые полезные нагрузки 2 и 6, соответственно, могут использоваться в цитологических анализах напрямую, так как являются стабильными. Тем не менее, для полезной нагрузки сшивающего агента 21, предлагаемой выпускаемой полезной нагрузкой является сульфгидрильное соединение 10. Так как соединение 10 может быть сильно химически активным, что могло бы привести к ненадежным результатам, в этих анализах, для представления выпускаемой полезной нагрузки, было выбрано соединение 25.

В отдельной серии опытов, соединение 6, вместе с аминowymi аналогами 27, 29 и 31 было проанализировано в HEK293 и U87MG на предмет антипролиферативной активности (фиг. 7). Все эти соединения имеют значения IC_{50} более 30 нМ, указывая на то, что они высоко цитотоксичны только в случае прикрепления к антителу с помощью соответствующего сшивающего агента. (Для этих экспериментов, фоновая коррекция с помощью дигитонина не производилась).

В еще одной серии опытов, соединения 6, 9, 33 и 35 были проанализированы в HEK293, U251, C4-2, PC3 и MMT на предмет анти-пролиферативной активности (фиг. 8). Аминосоединения 6, 33, и 35 имели переменные значения IC_{50} , как показано в табл. 2. Тенденция в эффективности следует $9 > 33 > 35 > 6$, и соответствует 5 проанализированным клеточным линиям.

Таблица 2

Соединение	IC ₅₀ (нМ)				
	HEK293	U251	C4-2	PC3	MMT
9	0.2	0.4	1.5	0.4	0.3
33	20	15	20	30	20
35	50	25	55	65	60
6	200	150	200	250	250

Не будучи привязанными к какой-либо теории, результаты этих экспериментов демонстрируют, что "выпущенная" или "не связанная с белками плазмы крови" версии соединений настоящего раскрытия (т.е., соединения, не сопряженные с антителом) были, в большинстве случаев, значительно менее цитотоксичными, чем будучи конъюгированными с антителом против клетки-мишени. Это свойство настоящего раскрытия означает, что конъюгаты антитела с лекарственным препаратом, составляющие соединения изобретения, дадут меньше побочных эффектов и меньше нежелательной токсичности, так как свойства уничтожения клетки будут специально сконцентрированы в месте целевого антигена.

Пример 15.

Конъюгаты антитела с лекарственным препаратом против EGFRvIII являются эффективными ингибиторами роста опухоли в физиологических моделях аллотрансплантатов, положительных на рак молочной железы EGFRvIII.

В этом примере два различных конъюгата антитела с лекарственным препаратом иллюстративного антитела H1H1863N2 против EGFRvIII были испытаны на их способность замедлять рост опухоли в организме. (Аминокислотная последовательность и различные свойства H1H1863N2 установлены в патенте США US61/950,963, зарегистрированном 11 марта 2014, настоящим включенным путем ссылки во всей полноте). H1H1863N2 содержит область вариабельности тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентификатор последовательности №1; область вариабельности легкой цепи (LCVR), имеющую идентификатор последовательности №5; антигенсвязывающие участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), имеющие идентификаторы последовательности №№: 2, 3 и 4 соответственно; и антигенсвязывающие участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), имеющие идентификаторы последовательности №№: 6, 7 и 8, соответственно.

Первый конъюгат антитела с лекарственным препаратом был получен путем сопряжения H1H1863N2 с майтанзиноидом DM1 с участием не расщепляемого сшивающего агента MCC (см., напр., патент США US №5,208,020 и патентную заявку США US № 20100129314) для получения "H1H1863N2-MCC-DM1". Второй конъюгат антитела с лекарственным препаратом был получен путем сопряжения H1H1863N2 с 7 для получения "H1H1863N2-7". При испытании на цитотоксичность вне организма против клеток MMT/EGFRvIII с помощью формата анализа, описанного в примере 14, H1H1863N2-MCC-DM1 показал значение IC₅₀ в 12 нМ, тогда как H1H1863N2-7 показал значение IC₅₀ только в 0,8 нМ. Таким образом, вне организма, конъюгат антитела с лекарственным препаратом против EGFRvIII, H1H1863N2-7, показал значительно более эффективную способность уничтожения опухолевых клеток, чем соответствующее антитело, сопряженное с DM1 с участием не сшивающего агента MCC.

Для сравнения действенности антител, конъюгированных с MCC-DM1 и 7 против EGFRvIII в организме, были проведены исследования на мышах с ослабленной иммунной системой, несущих аллотрансплантаты, положительные на рак молочной железы EGFRvIII. Вкратце, опухолевые аллотрансплантаты были установлены путем подкожной пересадки $0,5 \times 10^6$ MMT/EGFRvIII клеток в левую боковую поверхность самок мышей с ТКИН СВ17 (Taconic, Hudson, NY). После достижения опухолями среднего объема в 140 мм³ (примерно на 8 день), мыши были случайным порядком разделены на группы по семь особей, и получили конъюгаты антител с лекарственным препаратом против EGFRvIII, полученными с форматами сшивающего агента-препарата либо с MCC-DM1, либо с 7. Также анализировались и контрольные реактивы, включая несвязанные конъюгаты антител с лекарственным препаратом, полученными с форматами сшивающего агента-препарата либо с MCC-DM1, либо с 7, и "проводник", фосфатно-солевой буферный раствор. Конъюгаты антител с лекарственным препаратом вводились с дозировкой в 1 и 5 мг/кг три раза в день в течение одной недели, и впоследствии контролировались вплоть до достижения опухолями среднего объема около 2000 мм³ в группе, получавшей только "проводник". В этот момент было рассчитано угнетение роста опухоли.

Средний размер опухоли по сравнению с группой, получавшей только "проводник", рассчитывался следующим образом: опухоли измерялись дважды в неделю с помощью циркулей до достижения среднего размера у контрольной группы в 1000 мм³; размер опухоли был рассчитан с помощью формулы (длина × ширина²)/2. Угнетение роста опухоли было рассчитано в соответствии со следующей формулой:

$$(1 - ((T_{\text{оконч.}} - T_{\text{нач.}}) / (C_{\text{оконч.}} - C_{\text{нач.}}))) * 100,$$

где Т (группа лечения) и С (контрольная группа) представляют среднюю массу опухоли на день, когда опухоль у группы, получавшей только "проводник", достигла 1000 мм³. Результаты обобщены в табл. 3.

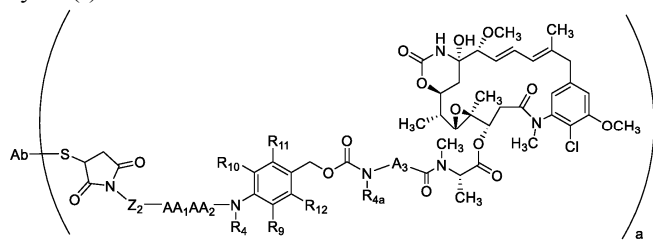
Таблица 3. Размер опухоли и угнетение роста опухоли после введения конъюгатов антител с лекарственным препаратом против EGFRvIII и контрольных препаратов, введенных с повторной дозой

Группа лечения	Окончательный размер опухоли на 8 день, мм ³ (среднее $\pm$ СКО)	Среднее угнетение роста опухоли (%)
“Проводник”, фосфатно-солевой буферный раствор	2253 $\pm$ 217	0
Контроль-MCC-DM1 (1 мг/кг)	2827 $\pm$ 278	-27
Контроль-MCC-DM1 (5 мг/кг)	2402 $\pm$ 256	-7
Контроль-7 (1 мг/кг)	2729 $\pm$ 470	-22
Контроль-7 (5 мг/кг)	2787 $\pm$ 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 (1 мг/кг)	931 $\pm$ 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 (5 мг/кг)	471 $\pm$ 227	84
H1H1863N2-7 (1 мг/кг)	679 $\pm$ 265	74
H1H1863N2-7 (5 мг/кг)	96 $\pm$ 34	102

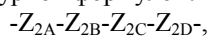
Как показано в данном примере, наибольшее угнетение опухоли наблюдалось у мышей, получавших 5 мг/кг H1H1863N2-7, у которых была отмечена регрессия первоначальной опухоли. Угнетение роста опухоли в 102% в результате лечения 5 мг/кг H1H1863N2-7 было значительно больше по сравнению с наблюдаемым последующим лечением опухоли 5 мг/кг H1H1863N2-MCC-DM1 (83%). Превосходство угнетения роста опухоли, вызванного H1H1863N2-7 по сравнению с H1H1863N2-MCC-DM1, также сохранилось и при дозировке в 1 мг/кг. Никакого влияния на опухоль не наблюдалось в группах, получавших контрольный конъюгат антитела с лекарственным препаратом с использованием MCC-DM1 или 7.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



где Z₂ представлен следующей структурной формулой:



где -Z_{2A}-, -Z_{2B}-, -Z_{2C}- и -Z_{2D}-, каждый независимо, являются отсутствующими, -C(=O)-, и C₁₋₆алкилен-, или -C(=S)-N(R₄)-;

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

AA₁-AA₂ представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланин;

a представляет собой целое число от одного до десяти;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

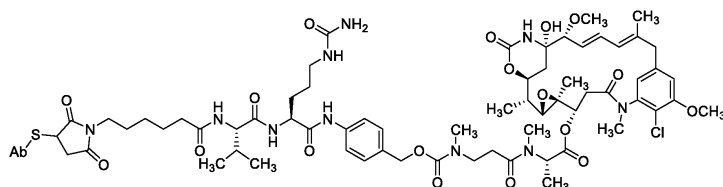
R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, и R₁₂ каждый представляет собой независимо водород или C₁₋₆алкил и

R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

2. Соединение по п.1, где Ab способен связываться со специально выбранной клеточной популяцией.

3. Соединение по п.1 или 2, где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающим опухолевый специфический антиген.

4. Соединение по п.1, представленное формулой (Ia)



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

5. Соединение по п.1, где AA₁-AA₂ является пептидным остатком, расщепляемым протеазой.

6. Соединение по п.1, в котором AA₁-AA₂ является пептидным остатком, расщепляемым протеазой, которую экспрессирует опухолевая ткань.

7. Соединение по п.6, где протеазой является катепсин или плазмин.

8. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или субстанций для лечения онкологических заболеваний.

9. Способ снижения, замедления или остановки роста аномальной клетки, состоящий из взаимодействия аномальной клетки с соединением по п.1.

10. Способ ликвидации клетки, состоящий из взаимодействия клетки с соединением по п.1.

11. Способ по п.11, где клетка является опухолевой клеткой.

12. Способ лечения онкологического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей соединение по п.1

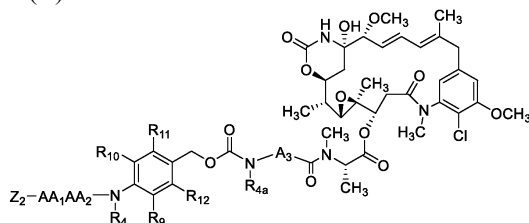
13. Способ по п.12, где субъект является млекопитающим.

14. Способ по п.12, дополнительно включающий последовательное или непрерывное применение дополнительной терапии, которой является радиационная терапия, химиотерапия или их сочетание.

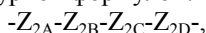
15. Способ по п.12, дополнительно включающий введение по меньшей мере одного дополнительного химиотерапевтического средства.

16. Способ уменьшения размера опухоли, прекращения увеличения размера опухоли, уменьшения разрастания опухоли или предотвращения распространения опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции для уменьшения размера опухоли, прекращения увеличения размера опухоли, уменьшения разрастания опухоли или предотвращения распространения опухоли, где композиция содержит соединение по п.1.

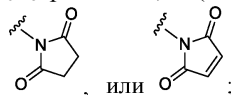
17. Соединение формулы (II)



где Z₂ представлен следующей структурной формулой:



где -Z_{2A}-, -Z_{2B}-, -Z_{2C}- и -Z_{2D}-, каждый независимо от остальных, является отсутствующим, C₁₋₆алкилом или C₁₋₆алкиленом-, C₆₋₁₈арилом или C₆₋₁₈ариленом-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S,



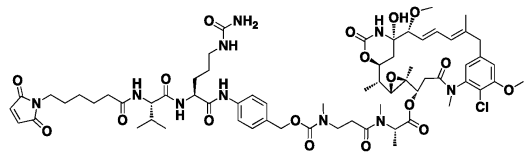
AA₁-AA₂ представляет собой пептидный остаток выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланин;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

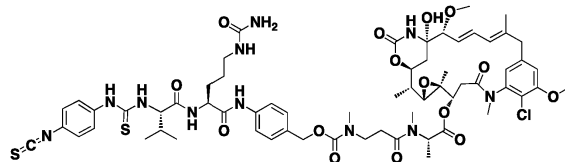
R₄, R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ каждый представляет собой независимо водород или C₁₋₆алкил; и

R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

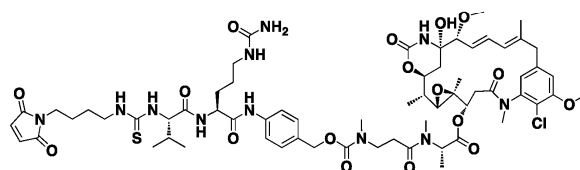
18. Соединение по п.17, имеющее формулу, выбранную из группы, состоящей из (IIa, IIb, IIc)



(IIa),

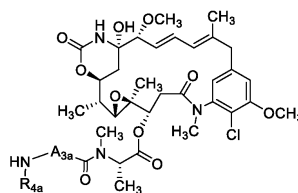


(IIb), и



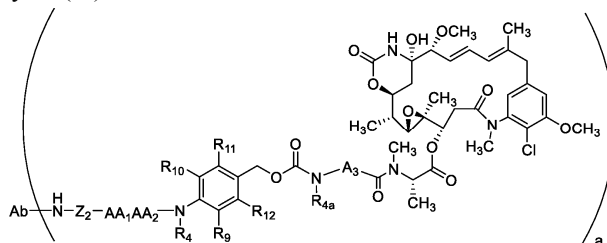
(IIc)

19. Соединение формулы (III)



где A_{3a} представляет собой $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ или $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ и R_{4a} представляет собой C_{1-6} -алкил.

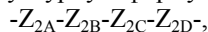
20. Соединение формулы (Ib)



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

a является целым числом от одного до десяти;

Z_2 представляет собой следующую структурную формулу:



где Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} и Z_{2D} , каждый независимо, являются отсутствующими, $-C(=O)-$, C_{1-6} -алкилен-, C_{6-18} арилен- или $-C(=S)-N(R_4)-$;

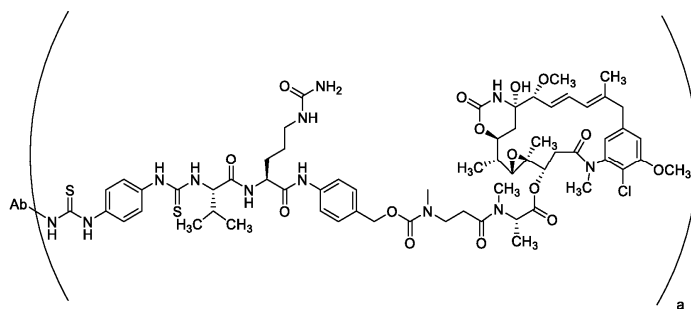
AA_1-AA_2 представляет собой пептидный остаток, выбранный из группы, включающей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланин;

A_3 представляет собой $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ или $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , и R_{12} каждый представляет собой независимо водород или C_{1-6} -алкил и

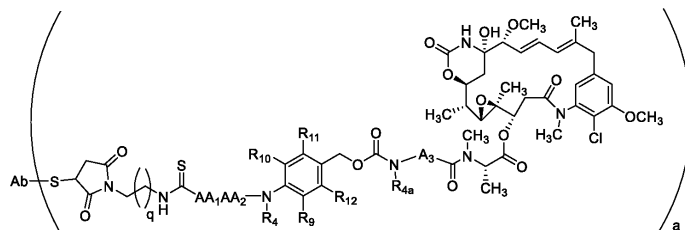
R_{4a} представляет собой C_{1-6} -алкил.

21. Соединение по п.20, представленное формулой (Ic)



где а является целым числом от одного до десяти.

22. Соединение формулы по п.1, имеющее формулу (Id)



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; AA₁-AA₂ является пептидным остатком, выбираемым из группы, содержащей валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин и аспарагин-аланин;

а является целым числом от одного до десяти;

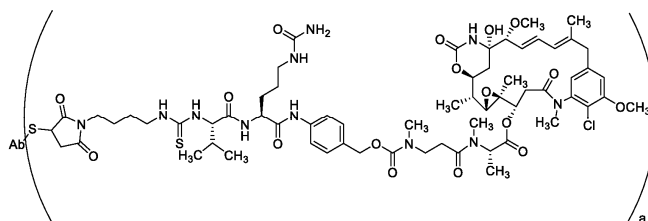
q представляет собой ноль или целое число от одного до пяти;

A₃ представляет собой -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, и R₁₂, каждый независимо, представляет собой водород или C₁₋₆алкил и

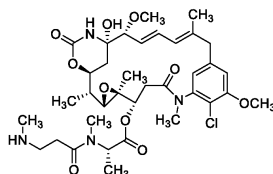
R_{4a} представляет собой C₁₋₆алкил.

23. Соединение по п.22, представленное формулой (Ii)

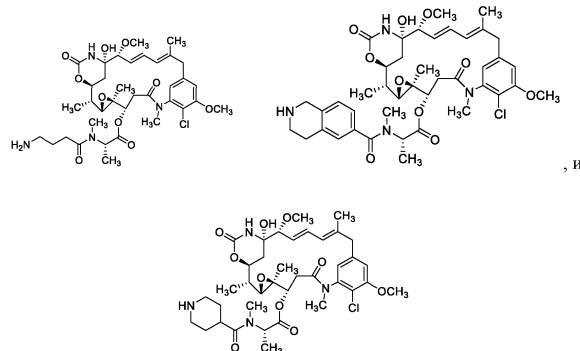


где а является целым числом от одного до десяти.

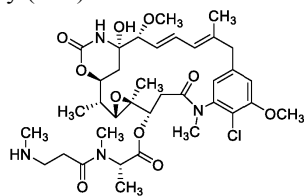
24. Соединение по п.19, имеющее формулу (IIIa)



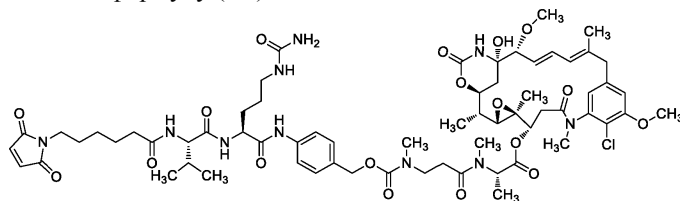
25. Соединение, имеющее формулу, выбранную из группы, включающей (IVa, IVb, и IVc)



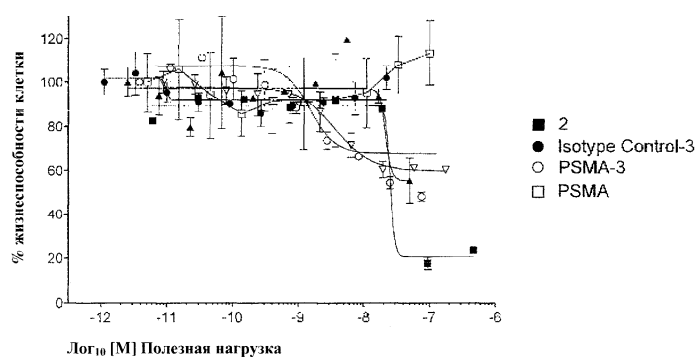
26. Соединение, имеющее формулу (IVd)



27. Соединение, имеющее формулу (IIId)

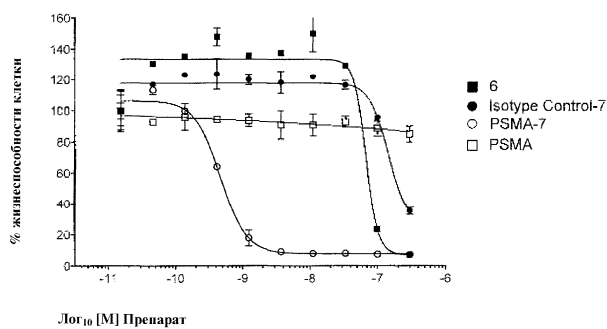


C4-2



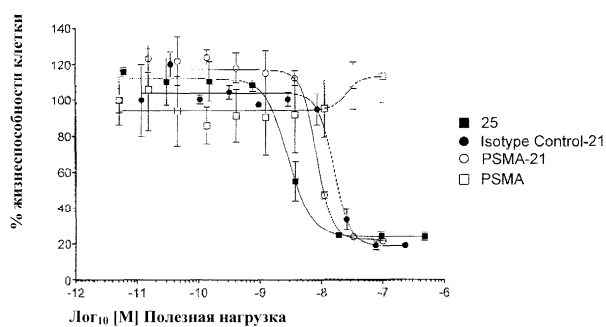
Фиг. 1А

C4-2



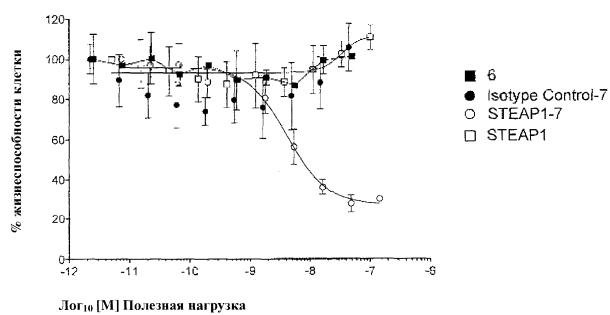
Фиг. 1В

C4-2



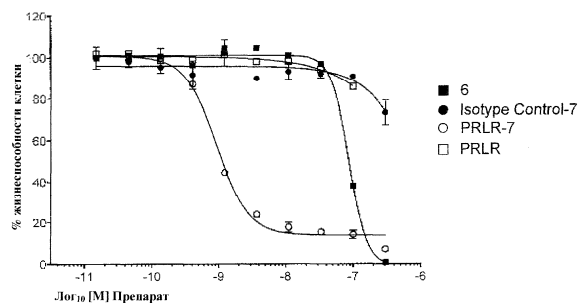
Фиг. 1С

PC3/hSTEAP1



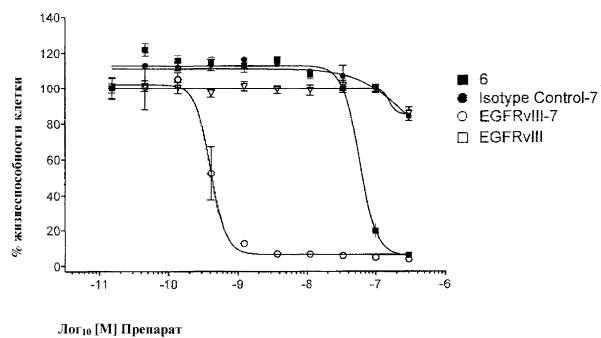
Фиг. 2

T47D



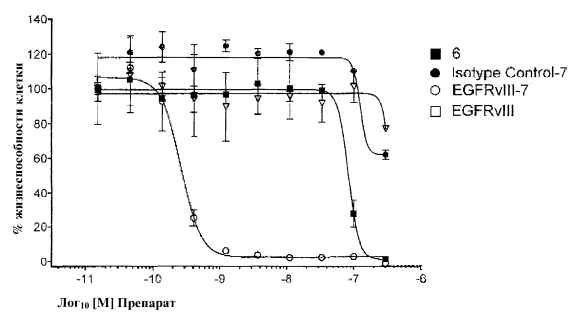
Фиг. 3

HEK293/hEGFRvIII

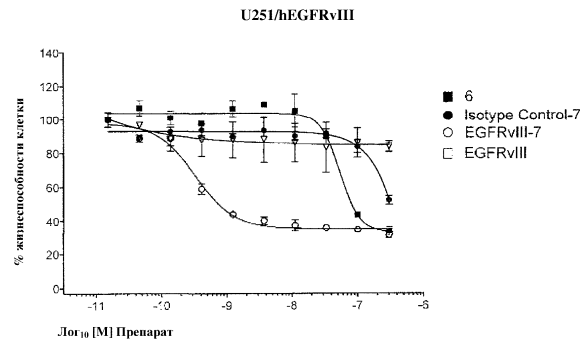


Фиг. 4

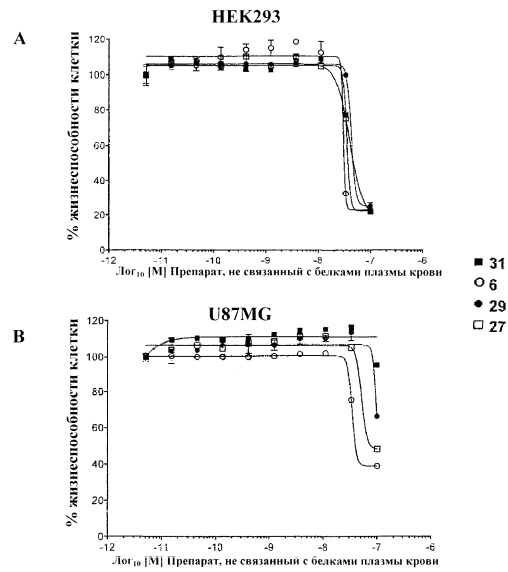
MMT/hEGFRvIII



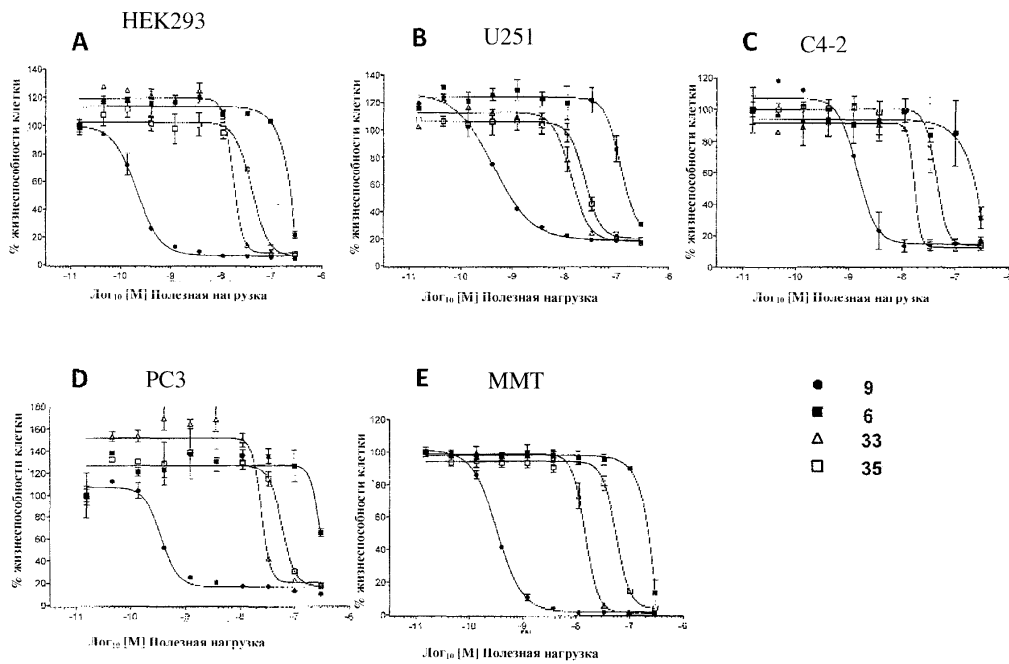
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

