

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191244 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.11

(22) Дата подачи заявки
2019.10.30

(51) Int. Cl. *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)

(54) НОВЫЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ С ЛИГАНДАМИ ИНТЕГРИНА

(31) 18204423.0

(32) 2018.11.05

(33) EP

(86) PCT/EP2019/079601

(87) WO 2020/094471 2020.05.14

(71) Заявитель:
БАЙЕР ФАРМА
АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(72) Изобретатель:
Лерхен Ханс-Георг, Стелте-Людвиг
Беатрикс, Копитц Шарлотте
Кристине (DE), Кельдених Йёрг (умер)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Парамонова К.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым фармацевтическим соединениям, состоящим из антагониста $\alpha_3\beta_3$ интегрин, связывающего звена, состоящего из L-Val-L-Pro-L-Asp, расщепляемого эластазой, полиэтиленгликолевого (PEG) спейсера и цитотоксического элемента, к способам их получения, к их применению для лечения, предупреждения или контроля заболеваний и состояний, в том числе гиперпролиферативных нарушений, таких как рак, у людей и других млекопитающих.

A1

202191244

202191244

A1

НОВЫЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ С ЛИГАНДАМИ ИНТЕГРИНА

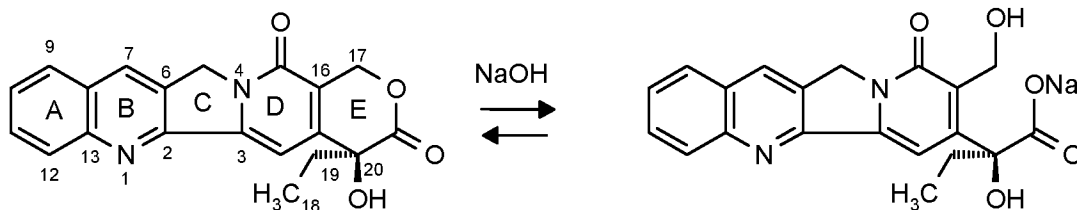
Описание

Настоящее изобретение относится к новым фармацевтическим соединениям, состоящим из антагониста $\alpha_v\beta_3$ интегрин, связывающего звена, состоящего из L-Val-L-Pro-L-Asp, расщепляемого эластазой, полиэтиленгликолевого (PEG) спейсера и цитотоксического элемента, к способам их получения, к их применению для лечения, предупреждения или контроля заболеваний и состояний, в том числе гиперпролиферативных нарушений, таких как рак, у людей и других млекопитающих.

Химиотерапия при раке обычно сопровождается серьезными побочными эффектами, которые следует отнести к токсическому действию химиотерапевтических средств на пролиферирующие клетки других типов тканей, отличных от опухолевой ткани. В течение многих лет ученые занимались проблемой улучшения селективности используемых активных соединений. Часто применяемым подходом является синтез пролекарств, которые высвобождаются более или менее селективно в целевой ткани, например, путем изменения pH (DE-A 4229903), с помощью ферментов (например, глюкуронидаз; EP-A 511917 и 595133) или с помощью конъюгатов антитело-фермент (WO 88/07378, US 4975278, EP-A 59 133). Проблема этих подходов заключается, среди прочего, в отсутствии стабильности конъюгатов в других тканях и органах и, в частности, в повсеместном распределении активного соединения, которое следует за внеклеточным высвобождением активного соединения в опухолевой ткани.

20(S)-Камптотецин представляет собой пентациклический алкалоид, который был выделен в 1966 году Wall et al. (J. Am. Chem. Soc. 88, 3888 (1966)). Он обладает высоким активным противоопухолевым потенциалом в многочисленных тестах *in vitro* и *in vivo*. К сожалению, реализация многообещающего потенциала на этапе клинических исследований не удалась из-за проблем с токсичностью и растворимостью.

Путем раскрытия E-кольца лактона и образования натриевой соли получили водорастворимое соединение, которое находится в зависимом от pH равновесии с формой с замкнутым кольцом. И в этом случае клинические исследования пока не привели к успеху.



Примерно 20 лет спустя обнаружили, что биологическая активность объясняется ферментативным ингибированием топоизомеразы I. С тех пор исследовательская деятельность снова была активизирована для поиска производного камптотецина, которое является более растворимым и более переносимым, и которое является активным *in vivo*.

Для улучшения растворимости в воде описали соли производных камптотецина, модифицированных по А-кольцу и В-кольцу, и 20-О-ацильных производных с ионизируемыми группами (US 4943579). Позднее концепцию последнего пролекарства перенесли на модифицированные производные камптотецина (WO 96/02546). Однако описанные 20-О-ацильные пролекарства имеют очень короткий период полужизни *in vivo* и очень быстро расщепляются с образованием исходной структуры.

Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные белки, обнаруженные на поверхности клеток, которые играют важную роль в адгезии клеток к внеклеточному матриксу. Они распознают внеклеточные гликопротеины, такие как фибронектин или витронектин, на внеклеточном матриксе с помощью последовательности RGD, присутствующей в этих белках (RGD представляет собой однобуквенный код для аминокислотной последовательности аргинин-глицин-аспартат).

В целом, интегрины, такие как, например, рецептор витронектина, который также называют $\alpha_v\beta_3$ рецептором, или, в качестве альтернативы, $\alpha_v\beta_5$ рецептором или рецептором GrPb/IIIa, играют важную роль в биологических процессах, таких как миграция клеток, ангиогенез и адгезия клеточного матрикса, и, следовательно, в заболеваниях, при которых эти процессы являются решающими стадиями. В качестве примера могут быть упомянуты рак, остеопороз, артериосклероз, рестеноз и офтальмия.

$\alpha_v\beta_3$ рецептор встречается, например, в больших количествах на растущих эндотелиальных клетках и делает возможной их адгезию с внеклеточным матриксом. Таким образом, $\alpha_v\beta_3$ рецептор играет важную роль в ангиогенезе, т. е. в образовании новых кровеносных сосудов, что является решающей предпосылкой для роста опухоли и образования метастазов при карциноматозных заболеваниях.

Удалось показать, что блокада вышеупомянутых рецепторов является важной отправной точкой для лечения нарушений этого типа. Если адгезия растущих эндотелиальных клеток к внеклеточному матриксу подавляется путем блокирования их соответствующих рецепторов интегрин, например, циклическим пептидом или моноклональным антителом, то ангиогенез не происходит, что приводит к остановке или регрессу роста опухоли (см., например, Brooks et al. в Cell 79, 1157-1164 (1994)).

В WO 98/10795 описываются конъюгаты, в которых молекула, нацеленная на опухоли, связана с функциональной единицей, такой как, например, цитостатическая или

детектируемая метка, такая как, например, радиоактивный нуклид. Среди прочего, антагонисты интегрина, такие как, например, пептиды, имеющие описанную выше последовательность RGD, описаны как молекулы, нацеленные на опухоли или строму опухоли. Доксорубицин описывается как пример цитостатического средства, который связан с молекулой этого типа, воздействующей на опухоли.

В случае раскрываемых в WO 98/10795 соединений связывание осуществляется таким образом, что молекула, направленная на опухоль, и функциональная единица напрямую связаны друг с другом с сохранением своих соответствующих свойств (см., например, стр. 56, строку 17, стр. 58, строку 10 и пример 6). Это приводит к тому, что эти соединения действительно селективно концентрируются в непосредственной близости от опухолевых клеток путем связывания объекта, направленного на опухоль (в случае радикала, обладающего антагонистическим действием в отношении $\alpha_v\beta_3$ интегрин, путем связывания с рецептором $\alpha_v\beta_3$ интегрин, который, в частности, экспрессируется на эндотелиальных клетках, вновь образованных в результате ангиогенеза), но из-за прямого сочетания функциональная единица, такая как, например, цитостатическое средство, не может высвободиться во внутриклеточное пространство опухолевой ткани.

По сути, конъюгат, который, с одной стороны, избирательно концентрируется в опухолевой ткани за счет действия части, направляющейся на рецепторы $\alpha_v\beta_3$ или $\alpha_v\beta_5$ интегрин, обнаруженные в конъюгате, но, с другой стороны, содержит цитостатическое средство, которое может высвободиться из конъюгата, должен обладать повышенным токсическим эффектом в отношении опухолевой ткани из-за возможности более прямого действия цитостатического средства на опухолевые клетки по сравнению с конъюгатами, описанными в WO 98/10795. В частности, такой токсический эффект и селективность в отношении опухоли должны быть даже выше, если высвобождение цитостатического средства происходит в непосредственной близости от опухолевой ткани или даже в опухолевых клетках.

В WO 00/69472 описаны активируемые ферментом противоопухолевые пролекарственные соединения, которые могут специфически расщепляться коллагеназой (IV) и эластазой. Что касается связывающих звеньев, расщепляемых эластазой, в этой заявке описывается, что таким образом подходят конкретные тетрапептидные последовательности Ala-Ala-Pro-Val и Ala-Ala-Pro-Nva. Кроме того, в этой ссылке не упоминаются конъюгаты, которые содержат фрагмент, направляющийся на рецепторы $\alpha_v\beta_3$ интегрин, и цитостатическое средство.

У Y. Liu et al. (Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 168) описываются конъюгаты ауристатинов, связанные с нацеливающимся на $\alpha_v\beta_3$ интегрин фрагментом посредством расщепляемого легумаинового линкера.

В ЕР 1238678 раскрыты конъюгаты с цитотоксическими средствами, которые нацеливаются на $\alpha_v\beta_3$ интегрины и имеют пептидные линкеры, которые могут специфически расщепляться эластазой. Что касается связывающих звеньев, расщепляемых эластазой, в этой заявке описаны пептидные последовательности, содержащие Pro-Val и Pro-Leu, которые поэтому являются подходящими. Примерами токсифорных фрагментов являются камптотецин и хинолонкарбоновая кислота.

Особые требования к таким конъюгатам включают в себя

- достаточную растворимость, позволяющую внутривенное введение в соответствующих средах-носителях,
- высокую проникающую способность интактных конъюгатов в опухоль,
- высокую стабильность в плазме, чтобы избежать системной деконъюгации,
- эффективное связывание с целевыми рецепторами в микроокружении опухоли,
- эффективное расщепление ферментами, присутствующими в микроокружении опухоли,
- высокую стабильность и клеточную проницаемость расщепленных токсифорных фрагментов для усиления поглощения опухолевыми клетками по сравнению с повторным распределением.

Поэтому одной из целей настоящего изобретения является разработка конъюгатов, которые содержат фрагмент, направленный на рецепторы $\alpha_v\beta_3$ интегрин, и цитостатическое средство, которое может высвобождаться из конъюгата, предпочтительно в микроокружении опухоли, при этом фрагмент в конъюгате, направленный на рецепторы $\alpha_v\beta_3$ интегрин, сохраняет свою способность связываться с рецептором $\alpha_v\beta_3$ интегрин и, следовательно, обеспечивает тканевую селективность таким соединениям. Кроме того, расщепляемость конъюгатов и высвобождение лекарственного средства должны опосредоваться ферментами, присутствующими и активными в окружении опухоли, такими как эластаза нейтрофилов. Наконец, профиль токсифора должен соответствовать внеклеточному механизму расщепления и высвобождения таким образом, чтобы он был в высокой степени проникающим в опухолевые клетки и ткани и не являлся субстратом для переносчиков лекарственных средств.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим соединениям, состоящим из антагониста $\alpha_v\beta_3$ интегрин, связывающего звена, расщепляемого эластазой,

полиэтиленгликолевого (PEG) спейсера и цитотоксического элемента (токсофора). Конъюгаты обладают опухолеспецифическим действием в результате связывания с антагонистами $\alpha_v\beta_3$ интегрина через предпочтительные связывающие звенья, которые могут селективно расщепляться эластазой, т. е. ферментом, который, в частности, может быть обнаружен в строме опухоли. Предпочтительные связывающие звенья обеспечивают достаточную стабильность конъюгата цитостатического средства и антагониста $\alpha_v\beta_3$ интегрина в биологических средах, например, в культуральной среде или сыворотке крови, и, в то же время, желаемое внутриклеточное действие в опухолевой ткани в результате его специфической ферментативной или гидролитической расщепляемости с высвобождением цитостатического средства.

В частности, соединения в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют благоприятные признаки:

- улучшенную стабильность конъюгатов после замещения тиомочевины группировкой мочевины,
- использование 7-этилкамптотецина в качестве особенно подходящего фрагмента токсифора,
 - благоприятное воздействие, например, на стабильность лактонового кольца (Drugs Fut 2002, 27(9), 869),
 - высокая клеточная проницаемость и низкий эффлюкс (по сравнению, например, с SN38),
- модифицированный спейсер с благоприятным воздействием на растворимость, аффинность связывания с интегрином, расщепляемость эластазой,
- накопление в опухоли токсифора после введения конъюгата по сравнению с прямым введением,
- превосходная терапевтическая эффективность на различных опухолевых моделях.

С этой целью 7-этилкамптотецин является особенно предпочтительным в качестве фрагмента токсифора в упомянутых выше конъюгатах.

Настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I)



в которой

СТ представляет собой одновалентный радикал из группы цитотоксического радикала, радикала цитостатического средства и радикала производного цитостатического средства, каждый из которых может дополнительно нести гидроксильную, карбоксильную или аминокгруппу;

LI представляет собой двухвалентный пептидный радикал формулы -L-Val-L-Pro-L-Asp-;

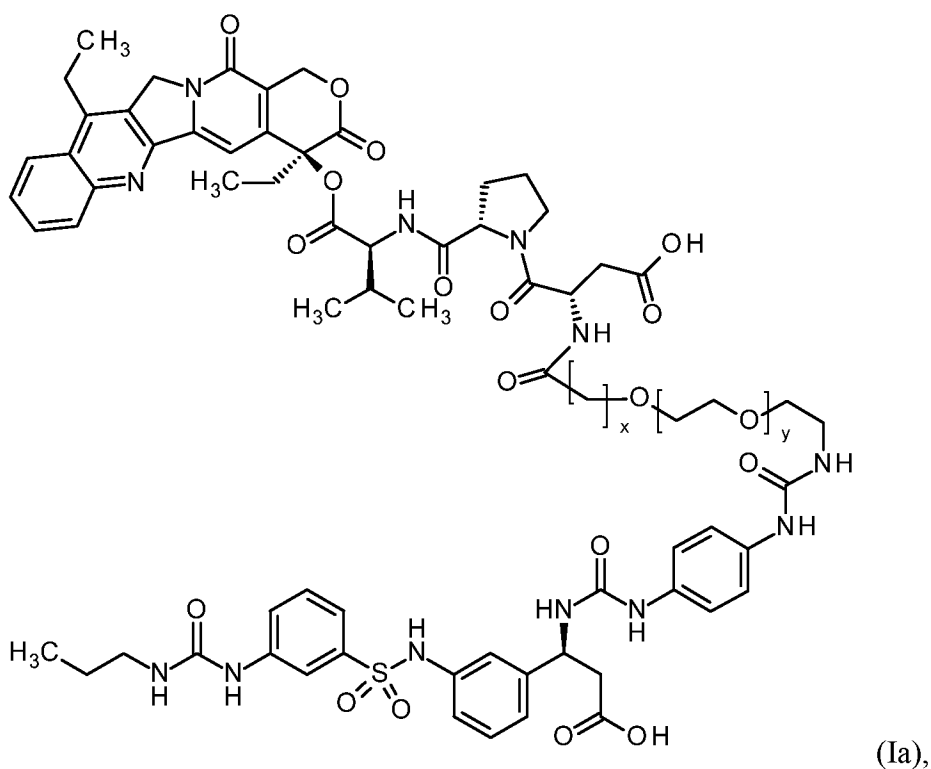
SP представляет собой группу формулы $-C=O-(CH_2)_x-O-(CH_2-CH_2-O)_y-CH_2-CH_2-NH-C=O-$, при этом $x = 1-5$, а $y = 0-15$;

IA представляет собой одновалентный радикал, направляющий на рецептор $\alpha_v\beta_3$ интегрин;

а также к их солям, сольватам и сольватам солей.

Двухвалентный пептидный радикал LI может быть связан с СТ или SP через его N-концевое или С-концевое положение. Предпочтительно LI связан с СТ через его С-концевое положение и с SP через его N-концевое положение.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к соединениям общей формулы (Ia)



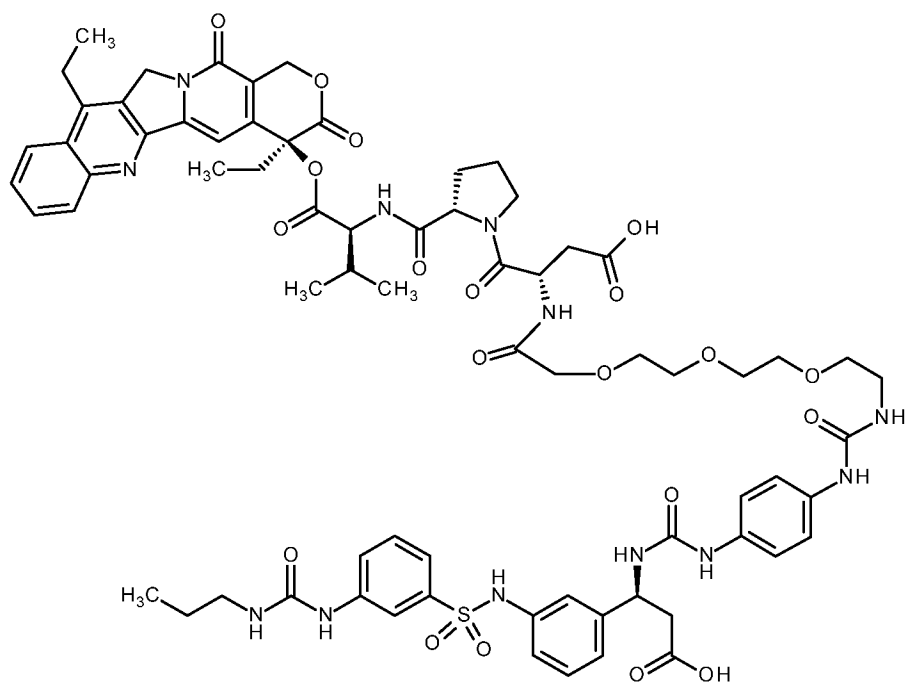
в которой x равняется 1-5, и $y = 0-15$,

а также к их солям, сольватам и сольватам солей.

Предпочтительным является соединение формулы (I) или (Ia), в которой x равняется 1-4, более предпочтительным является соединение формулы (Ia), в которой x равняется 1-2, наиболее предпочтительным является соединение формулы (Ia), в которой x равняется 2.

Предпочтительным является соединение формулы (I) или (Ia), в которой y равняется 0-10, более предпочтительным является соединение формулы (Ia), в которой y равняется 0-5, наиболее предпочтительным является соединение формулы (Ia), в которой y равняется 2.

Предпочтительным является соединение формулы II:



а также его соли, сольваты и сольваты солей.

Предпочтительными солями в соответствии с настоящим изобретением являются физиологически приемлемые соли заявляемых соединений. Также охватываются соли, которые сами по себе не подходят для фармацевтических применения, но могут быть использованы, например, для выделения, очистки или хранения заявляемых соединений.

Физиологически приемлемые соли заявляемых соединений, в частности, включают в себя кислотно-аддитивные соли минеральных кислот, карбоновых кислот и сульфоновых кислот, например, соли хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, толуолсульфоновой кислоты, нафталиндисульфоновой кислоты, муравьиной кислоты, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты, пропионовой кислоты, янтарной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты, яблочной кислоты, лимонной кислоты, глюконовой кислоты, бензойной кислоты и эмбоновой кислоты.

Кроме того, физиологически приемлемые соли заявляемых соединений также включают в себя соли, полученные из традиционных оснований, в качестве примера и предпочтительно, соли щелочных металлов (например, соли натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция и магния), соли цинка и соли аммония, полученные из аммиака или органических аминов, имеющих от 1 до 20 атомов углерода, в качестве примера и предпочтительно, этиламин, диэтиламин, триэтиламин, N,N-этилдиизопропиламин, моноэтаноламин, диэтаноламин, триэтаноламин, диметиламиноэтанол, диэтиламиноэтанол, трис(гидроксиметил)аминометан, холин,

бензалконий, прокаин, дибензиламин, дициклогексиламин, N-метилморфолин, N-метилпиперидин, аргинин, лизин и 1,2-этилендиамин.

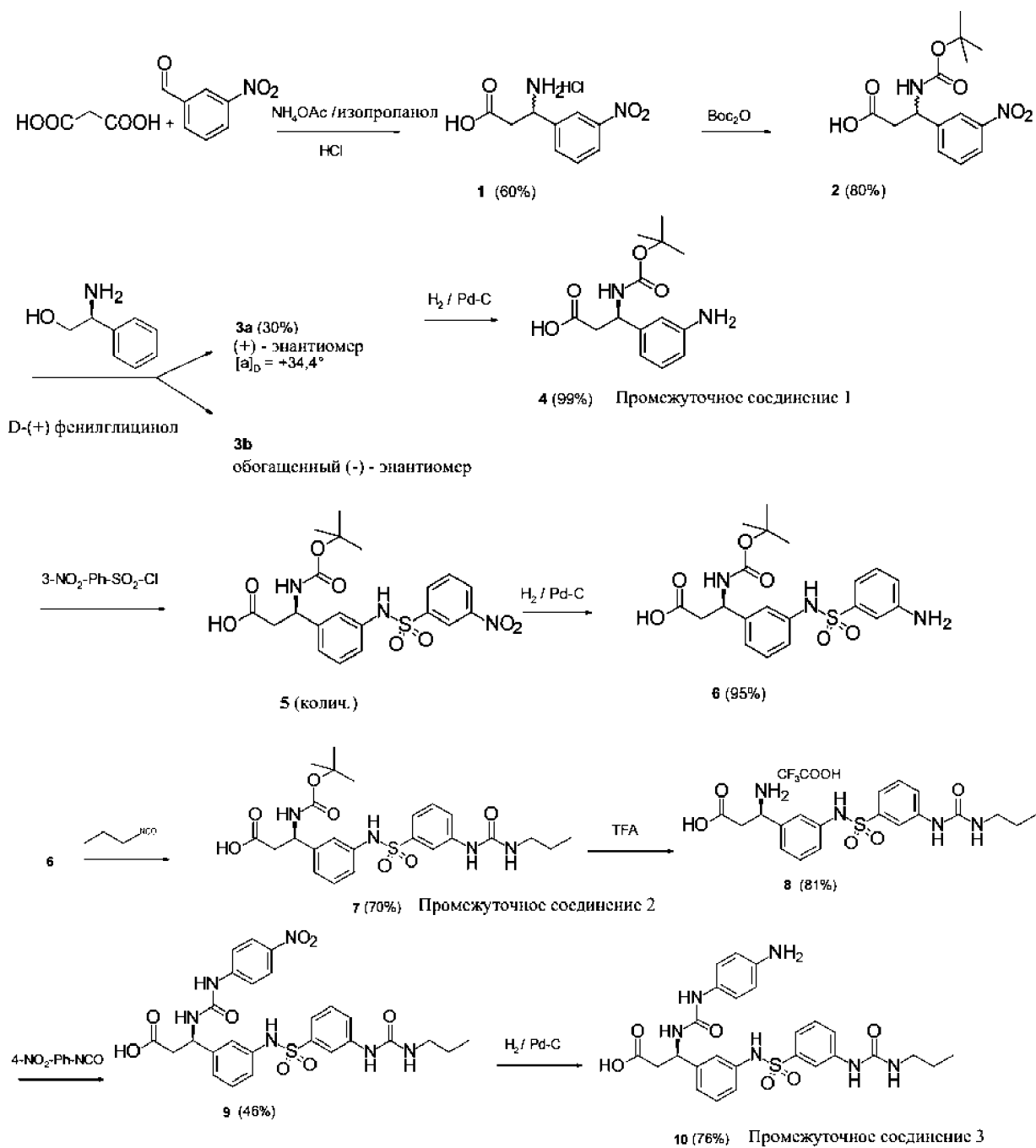
Предпочтительной солью является динатриевая соль соединения формулы (II).

Сольваты в соответствии с настоящим изобретением описываются как такие формы заявляемых соединений, которые образуют комплекс в твердом или жидком состоянии путем образования координационной связи с молекулами растворителя. Гидраты являются специфической формой сольватов, в которой координационная связь осуществляется с водой. Предпочтительными сольватами в соответствии с настоящим изобретением являются гидраты.

Настоящее изобретение также охватывает все подходящие изотопные варианты заявляемых соединений. Под изотопным вариантом заявляемого соединения в настоящем документе понимают соединение, в котором по меньшей мере один атом в заявляемом соединении заменен на другой атом с тем же атомным числом, но с другой атомной массой, чем атомная масса, которая обычно или преимущественно встречается в природе. Примерами изотопов, которые могут быть включены в заявляемое соединение, являются изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, хлора, брома и йода, такие как ^2H (дейтерий), ^3H (тритий), ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I и ^{131}I . Конкретные изотопные варианты заявляемого соединения, особенно те, в которые включены один или более радиоактивных изотопов, могут быть полезными, например, для исследования механизма действия или распределения активного ингредиента в организме; из-за сравнительной простоты получения и выявления для этой цели особенно подходят соединения, меченные изотопами ^3H , ^{14}C и/или ^{18}F . Кроме того, включение изотопов, например дейтерия, может обеспечивать особые терапевтические преимущества вследствие большей метаболической стабильности соединения, например, увеличение периода полужизни в организме или уменьшения необходимой активной дозы; такие модификации заявляемых соединений могут, таким образом, также составлять предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Изотопные варианты заявляемых соединений могут быть получены с помощью общепринятых способов, известных специалистам в данной области, например, способами, описанными ниже, и процедурами, описанными в рабочих примерах, с использованием соответствующих изотопных модификаций соответствующих реагентов и/или исходных соединений.

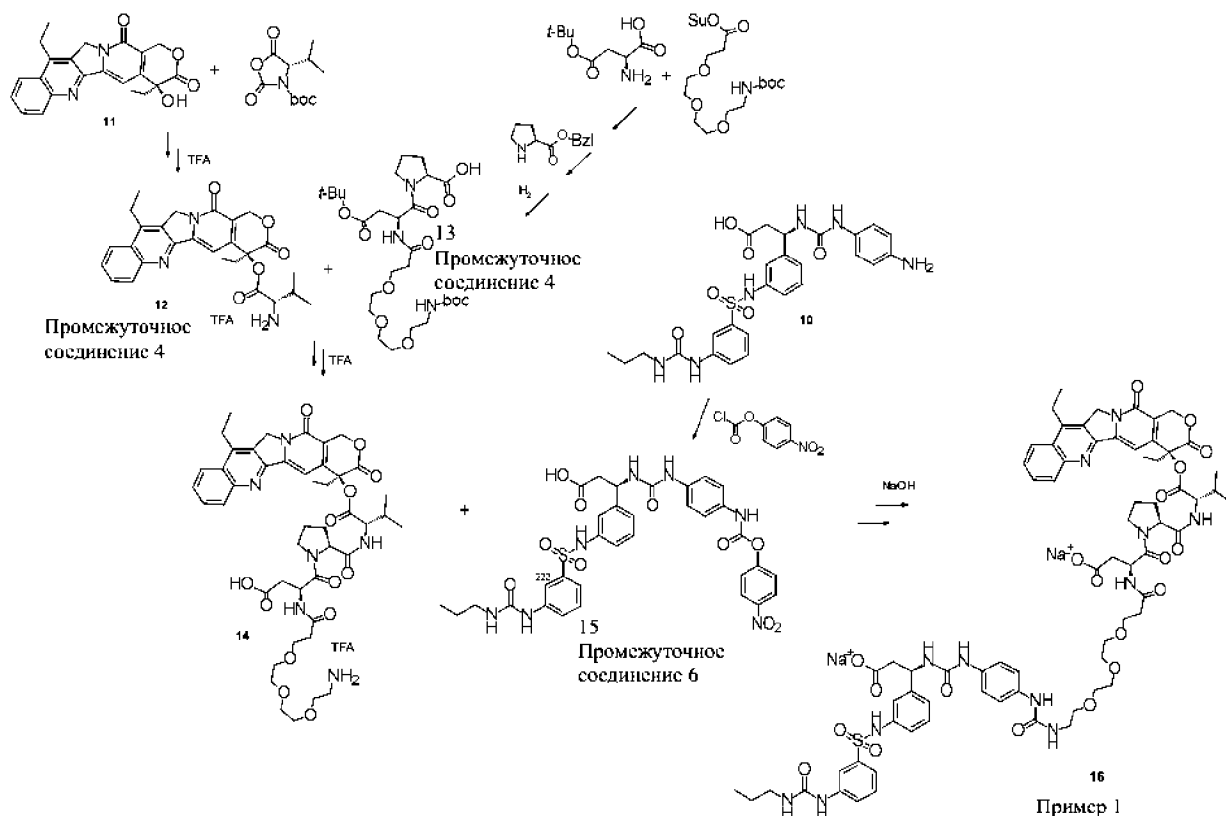
Синтез конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением (например, в примере 1) описан в приведенных ниже схемах.

Схема 1. Синтез лиганда $\alpha_v\beta_3$ интегрин



Разделение энантиомеров также может быть выполнено на разных стадиях посредством хроматографии с использованием хиральных колонок.

Схема 2. Синтез конъюгата $\alpha_v\beta_3$ интегрин с 7-этилcamптотецином



Способ лечения

Настоящее изобретение также относится к способу применения соединений и их композиций для лечения гиперпролиферативных нарушений у млекопитающих. Данный способ предусматривает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, в том числе человеку, количества соединения, которое эффективно для лечения нарушения. Гиперпролиферативные нарушения включают в себя без ограничения солидные опухоли, такие как раковые заболевания молочной железы, респираторного тракта, головного мозга, репродуктивных органов, пищеварительного тракта, мочевыводящих путей, глаза, печени, кожи, головы и шеи, щитовидной железы, паращитовидной железы, и их отдаленные метастазы. Такие нарушения также включают в себя лимфомы, саркомы и лейкозы.

Примеры рака молочной железы включают в себя без ограничения инвазивную протоковую карциному, инвазивную лобулярную карциному, протоковую карциному *in situ* и лобулярную карциному *in situ*.

Примеры раковых заболеваний респираторного тракта включают в себя без ограничения мелкоклеточную и немелкоклеточную карциному легкого, а также бронхиальную аденому и плеврорегочную бластому.

Примеры раковых заболеваний головного мозга включают в себя без ограничения глиому ствола головного мозга и гипоталамуса, церебеллярную и церебральную астроцитому, медуллобластому, эпендимому, а также нейроэктодермальную опухоль и

опухоль шишковидного тела.

Опухоли мужских репродуктивных органов включают в себя без ограничения рак предстательной железы и яичка. Опухоли женских репродуктивных органов включают в себя без ограничения рак эндометрия, шейки матки, яичника, вагины и вульвы, а также саркому матки.

Опухоли пищеварительного тракта включают в себя без ограничения раковые заболевания анального канала, толстой кишки, толстой и прямой кишки, пищевода, желчного пузыря, желудка, поджелудочной железы, прямой кишки, тонкой кишки и слюнных желез.

Опухоли мочевыводящие пути включают в себя без ограничения рак мочевого пузыря, полового члена, почки, почечной лоханки, мочеточника и уретры.

Раковые заболевания глаза включают в себя без ограничения внутриглазную меланому и ретинобластому.

Примеры раковых заболеваний печени включают в себя без ограничения гепатоклеточную карциному (карциному клеток печени с фиброламеллярным вариантом или без такового), холангиокарциному (карциному внутрипеченочных желчных протоков) и смешанную гепатоклеточную холангиокарциному.

Раковые заболевания кожи включают в себя без ограничения плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, злокачественную меланому, рак кожи из клеток Меркеля и немеланомный рак кожи.

Раковые заболевания головы и шеи включают в себя без ограничения ларингеальный/гипофарингеальный/назофарингеальный/орофарингеальный рак, а также рак губ и ротовой полости.

Лимфомы включают в себя без ограничения лимфому, связанную с AIDS, неходжкинскую лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, болезнь Ходжкина и лимфому центральной нервной системы.

Саркомы включают в себя без ограничения саркому мягких тканей, остеосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, лимфосаркому и рабдомиосаркому.

Лейкозы включают в себя без ограничения острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз.

Эти нарушения хорошо охарактеризованы у людей, но также встречаются с аналогичной этиологией у других млекопитающих, и их можно лечить путем введения фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением.

На основе стандартных лабораторных методик, известных для оценивания соединений, применимых для лечения гиперпролиферативных нарушений, с помощью стандартных тестов на токсичность и стандартных фармакологических анализов для определения лечения указанных выше состояний у млекопитающих, а также путем сравнения этих результатов с результатами известных лекарственных средств, которые применяют для лечения данных состояний, эффективная дозировка соединений в соответствии с настоящим изобретением может быть легко определена для лечения каждого желаемого показания. Количество активного ингредиента, вводимого при лечении одного из этих состояний, может широко варьировать в зависимости от таких критериев, как конкретное соединение и применяемая единица дозирования, способ введения, период лечения, возраст и пол больного, получающего лечение, а также характер и степень состояния, которое лечат.

Общее количество активного ингредиента, подлежащего введению, как правило, будет варьировать от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг массы тела в сутки и предпочтительно от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела в сутки. Клинически применимые схемы введения дозы будут варьировать от введения дозы один-три раза в сутки до введения дозы один раз каждые четыре недели. Кроме того, возможно, что «лекарственные каникулы», при которых больной не получает дозу лекарственного средства на протяжении определенного периода времени, могут быть полезными для общего баланса между фармакологическим эффектом и переносимостью. Однократная дозировка может содержать от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1500 мг активного ингредиента и может быть введена один или более раз в сутки или менее чем один раз в сутки. Средняя суточная дозировка для введения путем инъекции, в том числе внутривенной, внутримышечной, подкожной и парентеральной инъекций, и применения инфузионных методик предпочтительно будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Средний суточный режим ректального введения дозы предпочтительно будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Средний суточный режим вагинального введения дозы предпочтительно будет составлять от 0,01 до 200 мг/кг общей массы тела. Средний суточный режим местного введения дозы предпочтительно будет составлять от 0,1 до 200 мг, вводимых от одного до четырех раз в сутки. Предпочтительно чрескожная концентрация будет такой, которая требуется для поддержания суточной дозы от 0,01 до 200 мг/кг. Средний суточный режим ингаляционного введения дозы предпочтительно будет составлять от 0,01 до 100 мг/кг общей массы тела.

Конечно, конкретный начальный и непрерывный режим введения дозы для каждого больного будет варьировать в зависимости от природы и тяжести состояния, определяемого

лечащим диагностом, активности конкретного применяемого соединения, возраста и общего состояния больного, времени введения, способа введения, скорости выведения лекарственного средства, комбинации лекарственных средств и т. п. Желаемый способ лечения и количество доз соединения в соответствии с настоящим изобретением или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира или композиции могут быть установлены специалистами в данной области с использованием обычных врачебных тестов.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению соединения в соответствии с настоящим изобретением при получении фармацевтических композиций для лечения указанных выше нарушений.

Введение

Соединения в соответствии с настоящим изобретением могут обладать системной и/или локальной активностью. С этой целью их можно вводить подходящим способом, таким как, например, пероральный, парентеральный, легочный, назальный, подъязычный, лингвальный, буккальный, ректальный, вагинальный, кожный, чрескожный, конъюнктивальный, ушной путь или в виде имплантата или стента.

При таких путях введения соединения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в подходящих формах для введения.

Для перорального введения можно приготовить из соединений в соответствии с настоящим изобретением дозированные формы, известные в уровне техники, которые доставляют соединения в соответствии с настоящим изобретением быстро и/или модифицированным способом, такие как, например, таблетки (таблетки без покрытия или таблетки с покрытием, например, с энтеросолюбильными покрытиями или покрытиями с контролируемым высвобождением, которые растворяются с задержкой или являются нерастворимыми), таблетки, распадающиеся в ротовой полости, пленки/пластины, пленки/лиофилизаты, капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы), таблетки, покрытые сахаром, гранулы, пеллеты, порошки, эмульсии, суспензии, аэрозоли или растворы. В указанные дозированные формы можно включать соединения в соответствии с настоящим изобретением в кристаллической, и/или аморфизированной, и/или растворенной форме.

Парентеральное введение можно проводить, избегая стадии абсорбции (например, внутривенное, внутриартериальное, внутрисердечное, интраспинальное или интралюмбальное) или с включением абсорбции (например, внутримышечное, подкожное, внутрикожное, чрескожное или внутрибрюшинное). Формы для введения, которые подходят для парентерального введения, представляют собой, среди прочего, препараты

для инъекций и инфузий в форме растворов, суспензий, эмульсий, лиофилизатов или стерильных порошков.

Примерами, которые подходят для других путей введения, являются фармацевтические формы для ингаляции [среди прочего, с помощью порошковых ингаляторов, небулайзеров], капли в нос, растворы для носа, спреи для носа; таблетки/пленки/пластины/капсулы для лингвального, подъязычного или буккального введения; суппозитории; глазные капли, глазные мази, глазные ванночки, глазные вкладыши, ушные капли, ушные спреи, ушные порошки, ушные ополаскиватели, ушные тампоны; вагинальные капсулы, водные суспензии (лосьоны, взбалтываемые микстуры), липофильные суспензии, эмульсии, мази, кремы, чрескожные терапевтические системы (такие как, например, пластыри), молочко, пасты, пены, присыпки, имплантаты или стенты.

Соединения согласно изобретению могут быть включены в указанные формы введения. Это можно осуществить непосредственно известным способом путем смешивания с фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами. Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства включают в себя среди прочего

- наполнители и носители (например, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу (такую как, например, Avicel[®]), лактозу, маннит, крахмал, фосфат кальция (такой как, например, Di-Cafos[®])),
- основы для мазей (например, вазелиновое масло, парафины, триглицериды, воски, шерстяной воск, спирты шерстяного воска, ланолин, гидрофильную мазь, полиэтиленгликоли),
- основы для суппозиториев (например, полиэтиленгликоли, масло какао, твердый жир),
- растворители (например, вода, этанол, изопропанол, глицерин, пропиленгликоль, триглицериды жирных масел с цепью средней длины, жидкие полиэтиленгликоли, парафины),
- поверхностно-активные средства, эмульгаторы, дисперсанты или увлажнители (например, додецилсульфат натрия), лецитин, фосфолипиды, жирные спирты (такие как, например, Lanette[®]), сложные эфиры сорбита и жирной кислоты (такие как, например, Span[®]), полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбита и жирной кислоты (такие как, например, Tween[®]), полиоксиэтиленовые глицериды жирных кислот (такие как, например, Cremophor[®]), полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных кислот, полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных спиртов, глицериновые сложные эфиры жирных кислот, полочсамеры (такие как, например, Pluronic[®]),

- буферы, кислоты и основания (например, фосфаты, карбонаты, лимонную кислоту, уксусную кислоту, хлористоводородную кислоту, раствор гидроксида натрия, карбонат аммония, триметамол, триэтаноламин),
- изотонические средства (например, глюкозу, хлорид натрия),
- абсорбенты (например, высокодисперсные оксиды кремния),
- повышающие вязкость средства, гелеобразователи, загустители и/или связующие (например, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, крахмал, карбомеры, полиакриловые кислоты (такие как, например, Carbopol®); альгинаты, желатин),
- разрыхлители (например, модифицированный крахмал, карбоксиметилцеллюлозу натрия, натрия крахмалгликолят (такой как, например, Explotab®), поперечно сшитый поливинилпирролидон, кроскармеллозу натрия (такую как, например, AcDiSol®)),
- регуляторы текучести, смазочные средства, глйданты и средства, облегчающие выемку из формы (например, стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк, высокодисперсные оксиды кремния (такие как, например, Aerosil®)),
- материалы покрытия (например, сахар, шеллак) и пленкообразователи для пленок или диффузионные мембраны, которые растворяются быстро или модифицированным образом (например, поливинилпирролидоны (такие как, например, Kollidon®), поливиниловый спирт, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, этилцеллюлозу, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат целлюлозы, ацетат фталат целлюлозы, полиакрилаты, полиметакрилаты, такие как, например, Eudragit®)),
- материалы капсулы (например, желатин, гидроксипропилметилцеллюлозу),
- синтетические полимеры (например, полилактиды, полигликолиды, полиакрилаты, полиметакрилаты (такие как, например, Eudragit®), поливинилпирролидоны (такие как, например, Kollidon®), поливиниловые спирты, поливинилацетаты, полиэтиленоксиды, полиэтиленгликоли и другие сополимеры и блок-сополимеры),
- пластификаторы (например, полиэтиленгликоли, пропиленгликоль, глицерин, триацетин, триацетилцитрат, дибутилфталат),
- усилители проникновения,
- стабилизаторы (например, антиоксиданты, такие как, например, аскорбиновая кислота, аскорбилпальмитат, аскорбат натрия, бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуол, пропилгаллат),

- консерванты (например, парабены, сорбиновую кислоту, тиомерсал, хлорид бензалкония, ацетат хлоргексидина, бензоат натрия),
- красители (например, неорганические пигменты, такие как, например, оксиды железа, диоксид титана),
- ароматизаторы, подсластители, маскирующие вкус и/или запах средства.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одно соединение в соответствии с настоящим изобретением, обычно вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами, и к их применению в соответствии с настоящим изобретением.

Комбинации

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтическим комбинациям, в частности, к лекарственным средствам, содержащим по меньшей мере одно соединение общей формулы (I) или (Ia) в соответствии с настоящим изобретением и по меньшей мере один или более дополнительных активных ингредиентов, в частности, для лечения и/или профилактики гиперпролиферативного нарушения.

Используемый в настоящем изобретении термин «комбинация» известен специалистам в данной области, при этом указанная комбинация может быть фиксированной комбинацией, нефиксированной комбинацией или набором частей.

Используемый в настоящем изобретении термин «фиксированная комбинация» известен специалистам в данной области и определяется как комбинация, в которой, например, первый активный ингредиент, такой как одно или более соединений общей формулы (I) в соответствии с настоящим изобретением и дополнительный активный ингредиент присутствуют вместе в одной однократной дозировке или в одном препарате. Одним из примеров «фиксированной комбинации» является фармацевтическая композиция, в которой первый активный ингредиент и дополнительный активный ингредиент присутствуют в смеси для одновременного введения, например, в составе. Другим примером «фиксированной комбинации» является фармацевтическая комбинация, в которой первый активный ингредиент и дополнительный активный ингредиент присутствуют в одной единице, но не в смеси.

Используемые в настоящем изобретении термины «нефиксированная комбинация» или «набор частей» известны специалистам в данной области и определяются как комбинация, в которой первый активный ингредиент и дополнительный активный ингредиент присутствуют в более чем одной единице. Одним примером нефиксированной комбинации или набора частей является комбинация, в которой первый активный

ингредиент и дополнительный активный ингредиент находятся отдельно. Компоненты нефиксированной комбинации или набора частей можно вводить отдельно, последовательно, параллельно, одновременно или в хронологическом порядке.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде единственного фармацевтического средства или в комбинации с одним или более другими фармацевтически активными ингредиентами, если комбинация не вызывает неприемлемых побочных эффектов. Настоящее изобретение также относится к таким фармацевтическим комбинациям. Например, соединения в соответствии с настоящим изобретением можно комбинировать с известными активными ингредиентами для лечения и/или профилактики гиперпролиферативного нарушения.

Примеры активных ингредиентов для лечения и/или профилактики гиперпролиферативных нарушений включают в себя 131I-chTNT, абареликс, абемациклиб, абиратерон, акалабрутиниб, акларубицин, адалимумаб, адо-трастузумаб, эмтанзин, афатиниб, афлиберцепт, альдеслейкин, алектиниб, алемтузумаб, алендроновую кислоту, алитретиноин, альтретамин, амифостин, аминоклотеид, гексиламинолевулинат, амрубицин, амсакрин, анастрозол, анцестим, анетолдитиолтион, анетумабравтансин, ангиотензин II, антитромбин III, апалутамид, апрепитант, арцитумомаб, арглабин, триоксид мышьяка, аспарагиназу, атезолизумаб, авелумаб, аксикабтаген цилолеуцел, акситиниб, азациитидин, базиликсимаб, белотекан, бендамустин, безилесомаб, белиностат, бевацизумаб, бексаротен, бикалутамид, бисантрон, блеомицин, блинатумомаб, бортезомиб, бусерелин, босутиниб, брентуксимаб ведотин, бригаиниб, бусульфид, кабазитаксел, кабозантиниб, кальцитонин, фолиат кальция, левофолиат кальция, капецитабин, капромаб, карбамазепин, карбоплатин, карбоксон, карфилзомиб, кармофур, кармустин, катумаксомаб, целекоксиб, целмолейкин, церитиниб, цетуксимаб, хлорамбуцил, хлормадинон, хлорметин, цидофовир, цинакальцет, цисплатин, кладрибин, клодроновую кислоту, клофарабин, кобиметиниб, копанлизиб, крисантаспазу, кризотиниб, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даратумумаб, дарбэпоэтин альфа, дабрафениб, даролутамид, дазатиниб, даунорубицин, децитабин, дегареликс, денилейкин-дифтитокс, деносумаб, депреотид, деслорелин, дексразоксан, хлорид диброспидия, диангидрогалактитол, динутуксимаб, диклофенак, доцетаксел, доласетрон, доксифлуридин, доксорубицин, доксорубицин + эстрон, дронабинол, дурвалумаб, экулизумаб, эдреколомаб, эллиптиния ацетат, эндостатин, эноцитабин, энзалутамид, эпикадостат, эпирубицин, эпитиостанол, эпоэтин-альфа, эпоэтин-бета, эпоэтин-зета, эптаплатин, эрибулин, эрлотиниб, эзомепразол, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, этинилэстрадиол, эверолимус, экземестан, фадрозол, фентанил, филграстим,

флуоксиместерон, флоксуридин, флударабин, фторурацил, флутамид, фолиевую кислоту, форместан, фосапрепитант, фотемустин, фулвестрант, гадобутрол, гадотеридол, соль гадотериновой кислоты и меглумина, гадоверсетамида, гадоксетовую кислоту, нитрат галлия, ганиреликс, гефитиниб, гемцитабин, гемтузумаб, глюкарпидазу, глутоксим, GM-CSF, гозерелин, гранисетрон, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гистамин дигидрохлорид, гистрелин, гидроксикарбамид, источник излучения I-125, лансопразол, ибандроновую кислоту, ибритумомаб-тиуксетан, ибрутиниб, идарубицин, ифосфамид, иматиниб, имиквимод, импросульфат, индисетрон, инкадроновую кислоту, мебутат ингеннола, инотузумаб озогамидин, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, иобитридол, иобенгуан (1231), иомепрол, ипилимумаб, иринотекан, итраконазол, иксабепилон, иксазомиб, ланреотид, лансопразол, лапатиниб, лазохолин, леналидомид, ленватиниб, ленограстим, лентинан, летрозол, леупрорелин, левамизол, левоноргестрел, левотироксин натрия, лизурид, лобоплатин, ломустин, лонидамин, лютеций Lu 177 дотатат, масопротект, медроксипрогестерон, мегестрол, меларсопрол, мелфалан, мепитиостан, меркаптопурин, месна, метадон, метотрексат, метоксалан, метиламинолевулинат, метилпреднизолон, метилтестостерон, метирозин, мидостаурин, мифамуртид, милтефодин, мириплатин, митобронитол, митогуазон, митолактол, митомицин, митотан, митоксантрон, могамулизумаб, молграмостим, мопидамол, морфина гидрохлорид, морфина сульфат, Mvsi, набилон, набиксимолс, нафарелин, налоксон + пентазоцин, налтрексон, нартограстим, нецитумумаб, неапластин, неларабин, нератиниб, неридроновую кислоту, нетупитант/палонсетрон, ниволумаб, ниволумаб пентетреотид, нилотиниб, нилутамид, ниморазол, нимотузумаб, нимустин, нинтеданиб, нирапариб, нитракрин, ниволумаб, обинутузумаб, октреотид, офатумумаб, олапариб, оларатумаб, омацетаксин-мепесукцинат, омепразол, ондансетрон, опрелвекин, орготеин, орилотимод, осимертиниб, оксалиплатин, оксикодон, оксиметолон, озогамидин, p53-Gentherapie, паклитаксел, палбоциклиб, палифермин, источник излучения палладий-103, палонсетрон, памидроновую кислоту, панитумумаб, панобиностаб, пантопразол, пазопаниб, пегаспаргазу, PEG-эпоэтин бета (метокси-PEG-эпоэтин бета), пембролизумаб, пегфилграстим, PEG-интерферон-альфа-2b, пеметрексед, пентазоцин, пентостатин, пепломицин, перфлбутан, перфосфамид, пертузумаб, пицибанил, пилокарпин, пирарубицин, пиксантрон, плериксафор, пликамицин, полиглусам, полиэстрадиол фосфат, поливинилпирролидон + гиалуронат натрия, полисахарид-k, помалидомид, понатиниб, порфирин натрия, пралатрексед, преднимустин, преднизон, прокарбазин, прокодазол, пропранолол, хинаголид, рабепразол, ракотумомаб, радия-223 хлорид, радотиниб, ралоксифен, ралтитрексед, рамосетрон, рамуцирумаб, ранимустин, расбуриказу, разоксан, рефаметиниб, регорафениб, рибоциклиб,

ризедроновую кислоту, рения-186 этидронат, ритуксимаб, рогаратиниб, ролапитант, ромидепсин, ромиплостим, ромуртид, роникиклиб, рукапариб, самарий (^{153}Sm) лексидронам, сарграмостим, сарилумаб, сатумомаб, секретин, силтуксимаб, сипанолеуцел-Т, глицидидазол натрия, сонидегиб, сорафениб, станозолол, сизофиран, обузоксан, стрептозоцин, сунитиниб, талапорфин, талимоген лагерпарепвек, тамибаротен, тамоксифен, тапентадол, тазонермин, тецелейкин, технеций ($^{99\text{mTc}}$) нофетумомаб мерпентан, $^{99\text{mTc}}$ -HYNIC-[tyr3]-октреотид, тегафур, тегафур + гимерацил + отерацил, темопорфин, темозоломид, темсиролимус, тенипозид, тестостерон, тетрофосмин, талидомид, тиотепа, тималфазин, тиотропин альфа, тиогуанин, тисагенлеклейсел, тоцилизумаб, топотекан, торемифен, тозитумомаб, трабектедин, траметиниб, трамадол, трастузумаб, трастузум эмтанзин, треосульфат, третиноин, трифлуридин + типирацил, трилостан, трипторелин, траметиниб, трофосфамид, тромбopoэтин, триптофан, убенимекс, валатиниб, валрубицин, вандетаниб, вапреотид, вемурафениб, винбластин, винкрестин, виндезин, винфлунин, винорелбин, висмодегиб, вориностат, ворозол, стеклянные микрогранулы иттрия-90, зиностатин, зиностатин-стималамер, золедроновую кислоту, зорубицин.

Сокращения

В следующей таблице перечисляются используемые в настоящем документе сокращения.

Abu	γ-аминомасляная кислота
ACN	ацетонитрил
Boc	трет-бутилоксикарбонил
Bzl	бензил
DCM	дихлорметан
DIEA	диизопропилэтиламин (основание Хунига)
DMAP	диметиламинопиридин
DMF	диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
ee	энантиомерный избыток
FCS	эмбриональная телячья сыворотка
Fmoc	флуоренил-9-метоксикарбонил
HATU	2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат
HPLC	высокоэффективная жидкофазная хроматография

MTBE	метил-трет-бутиловый эфир
NMP	N-метилпирролидон
RP	обращенная фаза
к. т.	комнатная температура
RTV	относительный объем опухоли
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
TLC	тонкослойная хроматография

Различные аспекты настоящего изобретения, описанные в настоящей заявке, иллюстрируются следующими примерами, которые не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом.

Тестовые эксперименты примеров, описываемые в настоящем документе, служат для иллюстрации настоящего изобретения, и настоящее изобретение не ограничивается приведенными примерами.

Экспериментальная часть

Все реагенты, синтез которых не описан в экспериментальной части, либо коммерчески доступны, либо являются известными соединениями, либо могут быть получены специалистом в данной области из известных соединений известными способами.

Соединения и промежуточные соединения, полученные согласно способам в соответствии с настоящим изобретением, могут требовать очистки. Очистка органических соединений хорошо известна специалисту в данной области, и для очистки одного и того же соединения можно использовать несколько путей. В некоторых случаях очистка может быть не нужна. В некоторых случаях соединения могут быть очищены кристаллизацией. В некоторых случаях примеси можно удалить с использованием подходящего растворителя. В некоторых случаях соединения могут быть очищены хроматографией, в частности, колоночной флэш-хроматографией, с использованием, например, предварительно упакованных картриджей с силикагелем, например, картриджей KP-Sil® или KP-NH® Biotage SNAP в сочетании с системой автоочистки Biotage (SP4® или Isolera Four®), и элюентов, таких как градиенты гексана/этилацетата или DCM/метанола. В некоторых случаях соединения могут быть очищены с помощью препаративной HPLC с использованием, например, автоматического очистителя Waters, оснащенного детектором с диодной матрицей и/или встроенным масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением, в сочетании с подходящей предварительно упакованной обращенно-фазовой колонкой и элюентами, такими как градиенты воды и ацетонитрила, которые могут

содержать добавки, такие как трифторуксусная кислота, муравьиная кислота или водный раствор аммиака.

В некоторых случаях способы очистки, описываемые выше, могут обеспечить те соединения в соответствии с настоящим изобретением, которые обладают достаточно основной или кислотной функциональностью в форме соли, например, в случае соединения в соответствии с настоящим изобретением, которое является достаточно основным, соль трифторацетата или формиата, например, или в случае соединения в соответствии с настоящим изобретением, которое является достаточно кислым, например, соль аммония. Соль этого типа либо может быть преобразована в форму свободного основания или свободной кислоты, соответственно, различными способами, известными специалисту в данной области, либо может быть использована в качестве солей в последующих биологических анализах. Следует учитывать, что конкретная форма (например, соль, свободное основание и т. д.) соединения в соответствии с настоящим изобретением в том виде, в каком оно выделено и как описано в настоящем документе, не обязательно является единственной формой, в которой указанное соединение может применяться в биологическом анализе для количественной оценки определенной биологической активности.

Стандартные процедуры UPLC-MS

Аналитическую UPLC-MS выполняли, как описано ниже. Массы (масса/заряд) регистрировали при ионизации электрораспылением в положительном режиме, если не указан отрицательный режим (ESI-). В большинстве случаев использовали способ 1. Если нет, то это указывается.

Способы HPLC- и LC-MS

Способ 0

Определение массы проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (HPLC-MS) с использованием способа ионизации электронным распылением (ESI) или с помощью масс-спектропии FAB или MALDI.

Способ 1 (LC-MS)

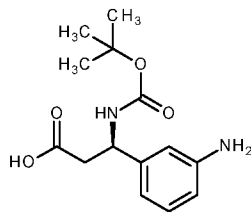
Прибор: Waters ACQUITY SQD UPLC System; колонка: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 мк 50 × 1 мм; элюент А: 1 л воды + 0,25 мл 99% муравьиной кислоты, элюент В: 1 л ацетонитрила + 0,25 мл 99% муравьиной кислоты; градиент: 0,0 минуты 90% А → 1,2 минуты 5% А → 2,0 минуты 5% А; подогрев: 50°C; поток: 0,40 мл/минута; УФ-выявление: 208-400 нм.

ПРИМЕРЫ

Исходные материалы и промежуточные соединения

Промежуточное соединение 1

(3R)-3-(3-Аминофенил)-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]пропионовая кислота



Смесь 151 г 3-нитробензальдегида, 94 г ацетата аммония, 127 г малоновой кислоты и 1 л 2-пропанола нагревали с обратным холодильником в течение 5 часов. Раствор фильтровали и осадок промывали с помощью 0,7 л горячего 2-пропанола. Неочищенный продукт сушили в вакууме, суспендировали в 1,5 л воды, обрабатывали 1 н. хлористоводородной кислотой и фильтровали. Фильтрат концентрировали с получением 146 г.

ЯМР (400 МГц, D₄-метанол): δ = 3,09 (m, 2 H), 4,88 (m, 1 H), 7,74 (t, 1 H), 7,90 (d, 1 H), 8,33 (d, 1 H), 8,43 (s, 1 H).

20 г (95 ммоль) этого промежуточного соединения и 31,2 г ди-трет-бутилбикарбоната растворяли в 150 мл смеси диоксана/воды (1:1) и добавляли 33 мл DIEA. Смесь взбалтывали в течение приблизительно 90 минут до наблюдения полного растворения. После выпаривания растворителя оставшийся остаток растворяли в 1 л DCM и 3 раза экстрагировали с помощью 500 мл 5% лимонной кислоты. Органическую фазу концентрировали, продукт осаждали смесью DCM/диэтилового эфира/петролейного эфира 1:1:1 и фильтровали. После сушки получали 23,5 г (80%) желаемого продукта.

5 г (16,1 ммоль) этого промежуточного соединения и 3,095 г (23 ммоль) (2R)-2-амино-2-фенилэтанола растворяли в ацетонитриле и оставляли при 0°C на 3 суток. Осадок фильтровали, растворяли в DCM и 2 раза экстрагировали с помощью 5% лимонной кислоты. Органическую фазу сушили с помощью сульфата натрия и выпаривали. Эту процедуру повторяли дважды. Получали 1,52 г (30%) желаемого продукта с ее 95% и $[\alpha]_D^{25} = +34,4^\circ/\text{метанол}$.

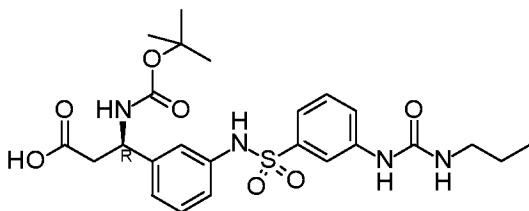
1500 мг (0,243 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 100 мл метанола и гидрогенизировали с помощью палладия на угле в течение 30 минут при нормальном давлении. Катализатор отделяли, раствор концентрировали, расщепляли

диэтиловым эфиром, фильтровали и остаток сушили в вакууме. Получали 1334 мг (98%) указанного в названии соединения.

[DC: (дихлорметан/метанол/аммиак (17%) (15:4:0,5); $R_f = 0,18$].

Промежуточное соединение 2

(3R)-3-[(Трет-бутоксикарбонил)амино]-3-{3-[(3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил)сульфонил)амино]фенил}пропионовая кислота



8300 мг (29,6 ммоль) промежуточного соединения 1 и 9843 мг (44,4 ммоль) 3-нитробензолсульфонилхлорида растворяли в 400 мл DCM/DMF 1:1 и добавляли 7,2 мл пиридина. Смесь взбалтывали на протяжении ночи при комнатной температуре. Затем смесь разбавляли с помощью 200 мл DCM и экстрагировали 3 раза с помощью 50 мл 5% лимонной кислоты. Органическую фазу концентрировали. После сушки оставшегося остатка получали 13,8 г (колич.) (3R)-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3-(3-{[(3-нитрофенил)сульфонил]амино}фенил)пропионовой кислоты.

[DC: (дихлорметан/метанол/аммиак (17%) (15:4:0,5); $R_f = 0,2$].

13800 мг (29,65 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 1000 мл метанола и гидрогенизировали с помощью палладия на угле в течение 5 часов при нормальном давлении. Катализатор отделяли, раствор концентрировали и остаток дважды промывали диэтиловым эфиром, а затем сушили в вакууме. Получали 12240 мг (95%) (3R)-3-(3-{[(3-аминофенил)сульфонил]амино}фенил)-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]пропионовой кислоты.

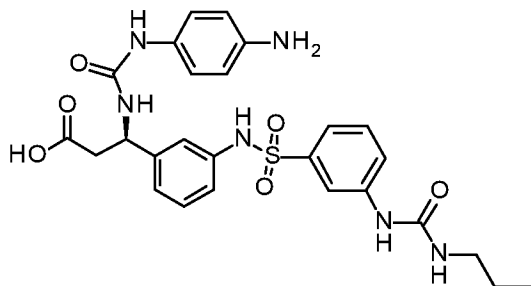
12200 мг (28 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 600 мл диоксана, добавляли 5722 мг (67 ммоль) 1-изоцианатопропана и смесь взбалтывали на протяжении ночи. Раствор концентрировали в вакууме и оставшийся остаток очищали флэш-хроматографией со смесью элюентов DCM/метанол/ NH_4OH (17%) 15/4/0,5. Соответствующие фракции собирали и концентрировали в вакууме. После сушки остатка в вакууме получали 11220 мг (67%) указанного в названии соединения.

LC-MS (способ 1): $R_t = 0,9$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 521 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Промежуточное соединение 3

(3R)-3-{[(4-аминофенил)карбамоил]амино}-3-{3-[(3-

[(пропилкарбамоил)амино]фенил}сульфонил)амино]фенил}пропионовая кислота



400 мг (0,768 ммоль) промежуточного соединения 2 растворяли в 10 мл DCM и добавляли 2 мл трифторуксусной кислоты. После взбалтывания в течение 90 минут при комнатной температуре реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток обрабатывали 5% раствором гидрокарбоната натрия, а затем растворяли в смеси DCM/метанола. После осаждения с помощью диэтилового эфира, фильтрации и сушки в вакууме получали 260 мг (81%) (3R)-3-амино-3-{3-[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил}сульфонил)амино]фенил}пропионовой кислоты.

LC-MS (способ 0): $R_t = 4,11$ минуты; MS: масса/заряд = 421 = $(M+H)^+$.

250 мг (0,595 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 15 мл DMF, добавляли 117 мг (0,713 ммоль) 1-изоцианато-4-нитробензола и раствор взбалтывали в течение 30 минут при комнатной температуре. Добавляли еще 30 мг 1-изоцианато-4-нитробензола и взбалтывание продолжали в течение 30 минут. Раствор концентрировали в вакууме и оставшийся остаток очищали флэш-хроматографией. После концентрирования соответствующих фракций в вакууме получали 160 мг (46%) (3R)-3-[[4-нитрофенил)карбамоил]амино]-3-{3-[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил}сульфонил)амино]фенил}пропионовой кислоты.

LC-MS (способ 0): $R_t = 5,61$ минуты; MS: масса/заряд = 585 = $(M+H)^+$.

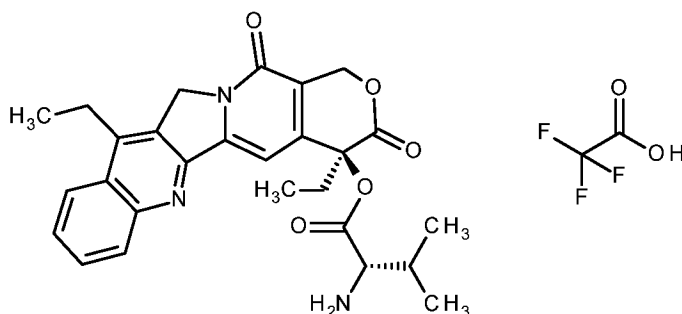
142 мг (0,243 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 20 мл метанола/DCM 10:1 и гидрогенизировали с помощью палладия на угле в течение 30 минут при нормальном давлении. Катализатор отделяли, раствор концентрировали, расщепляли диэтиловым эфиром, фильтровали и остаток сушили в вакууме. Получали 103 мг (76%) указанного в названии соединения.

LC-MS (способ 0): $R_t = 4,31$ минуты; MS: масса/заряд = 555 = $(M+H)^+$.

^1H -ЯМР (500 МГц, D_4 -метанол): $\delta = 0,93$ (t, 3 H), 1,5 (m, 2 H), 2,74 (d, 2 H), 3,1 (dt, 2 H), 5,15 (t, 1 H), 6,68 (d, 2 H), 6,85 (d, 1 H), 7,05 (d, 1 H), 7,1 (d, 1 H), 7,13 (t, 1 H), 7,28-7,4 (m, 3H), 7,6 (s, 1 H), 7,66 (d, 1 H).

Промежуточное соединение 4

(4S)-4,11-Диэтил-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил-L-валината трифторацетат (1:1)



2,59 г (10,6 ммоль) N-(трет-бутоксикарбонил)-валин-N-карбоксиангидрида и 0,5 г 4-(N,N-диметиламино)-пиридина добавляли в перемешиваемую суспензию 2 г (5,3 ммоль) (4S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14-(4H,12H)-диона (7-этилкамптотецина, синтезированного, как описано у S. Sawada et al. в Chem. Phar. Bull 1991-39(6)-1445) в 150 мл абсолютного дихлорметана. Смесь взбалтывали при комнатной температуре в течение 20 часов, а затем концентрировали в вакууме. К остатку добавляли 8 мл ACN, а затем 5 мл диэтилового эфира. Смесь фильтровали и оставшийся остаток сушили в вакууме. Получали 2964 мг (92%) защищенного промежуточного соединения.

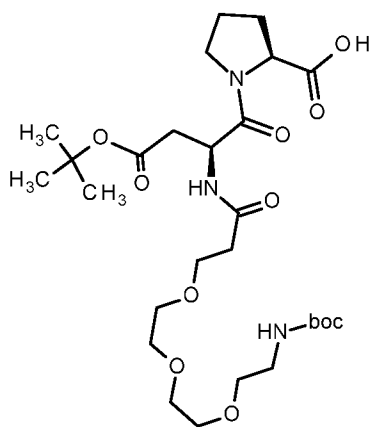
LC-MS (способ 1): Rt = 1,19 минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 576 (M+H)⁺.

2964 мг (5,15 ммоль) этого Вос-защищенного промежуточного соединения в 6 мл дихлорметана и 60 мл безводной трифторуксусной кислоты взбалтывали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем обрабатывали ультразвуком в течение 1 часа. После концентрирования в вакууме продукт лиофилизировали из смеси ацетонитрила/воды. Получали 3,622 г (колич.) указанного в названии соединения.

LC-MS (Способ 1): Rt = 0,68 минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 476 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 5

(2S)-1-[(19S)-19-(2-Трет-бутокси-2-оксоэтил)-2,2-диметил-4,17,20-триоксо-3,8,11,14-тетраокса-5,18-дизаикосан-20-ил]пирролидин-2-карбоновая кислота

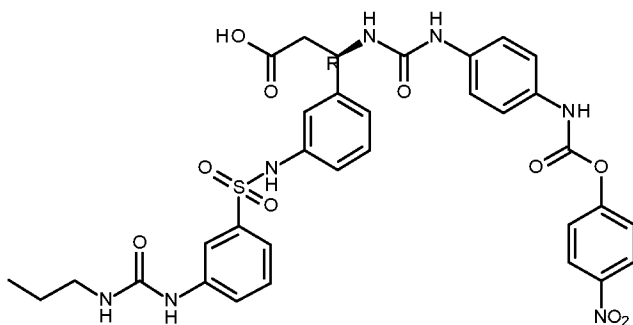


Данное промежуточное соединение 5 синтезировали согласно классическим способам, известным в химии пептидов, начиная с сочетания 4-трет-бутил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-N-(трет-бутоксикарбонил)-L-аспартата с бензил-L-пролината гидрохлоридом (1:1) в DMF в присутствии DIEA, а затем расщепляли сложный бензиловый эфир путем гидрогенизации с помощью палладия на угле. Затем трет-бутоксикарбонильную защитную группу удаляли путем взбалтывания раствора (2S)-1-((2S)-4-трет-бутокси-2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-4-оксобутаноил)пирролидин-2-карбоновой кислоты в течение 15 минут в смеси 15 мл TFA и 100 мл DCM с последующей очисткой флэш-хроматографией с использованием DCM/метанола 3:1 в качестве элюента. Это промежуточное соединение растворяли в DMF и сочетали в присутствии DIEA с трет-бутил-{2-[2-(2-{3-[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]-3-оксопропокси}этокси)этокси]этил}карбаматом (ранее полученным путем преобразования 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11,14-тетраокса-5-азагептадекан-17-оевой кислоты в активированный сложный эфир в DMF с 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дионом и EDCI).

LC-MS (способ 1): $R_t = 0,86$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 590 ($M+H$)⁺.

Промежуточное соединение 6

(3R)-3-[[[4-[[[4-Нитрофенокси]карбонил]амино}фенил]карбамоил]амино]-3-{3-[[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил]сульфонил]амино]фенил}пропионовая кислота

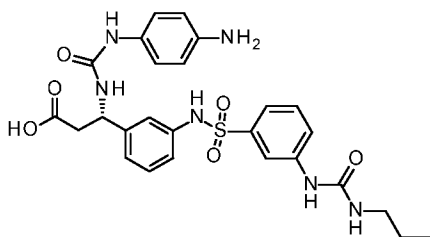


8,99 г (43,3 ммоль) 4-нитрофенилкарбонохлоридата растворяли в 1300 мл THF и добавляли 12 г (21,64 ммоль) (3R)-3-{{[(4-аминофенил)карбамоил]амино}-3-{3-[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил]сульфонил)амино]фенил}пропионовой кислоты. Смесь нагревали и взбалтывали в течение 45 минут с обратным холодильником, а затем охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении до объема 100 мл. Этот раствор выливали в диэтиловый эфир и осадок фильтровали. После сушки на протяжении ночи в вакууме получали 11,6 г указанного в названии соединения.

LC-MS (способ 1): $R_t = 0,97$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 720 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 7. Эталонное соединение для лиганда интегрин (S-эпимер промежуточного соединения 3)

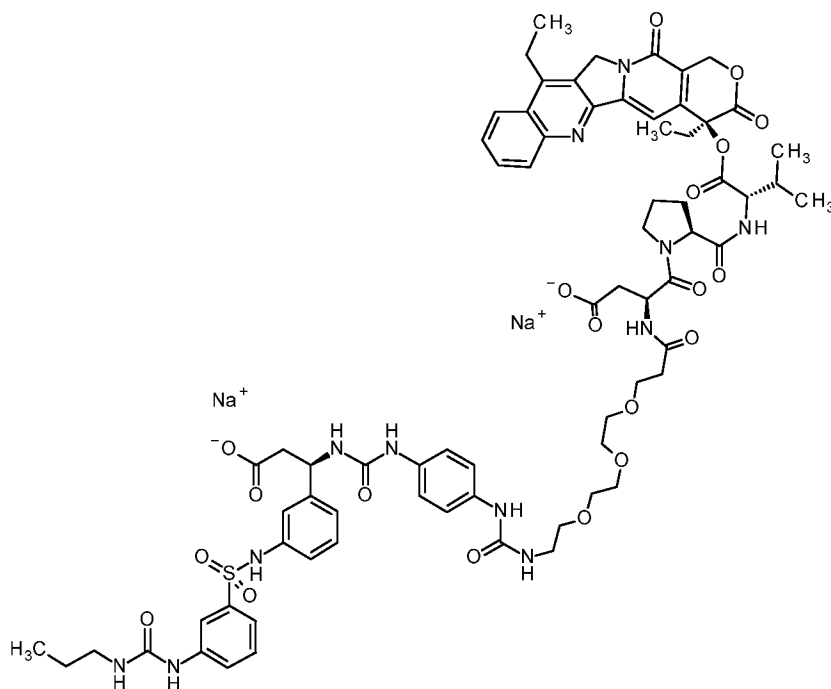
(3S)-3-{{[(4-Аминофенил)карбамоил]амино}-3-{3-[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил]сульфонил)амино]фенил}пропионовая кислота



Это соединение синтезировали по аналогии с промежуточным соединением 3, упомянутым выше, с использованием эпимера промежуточного соединения 1, который находился в маточном растворе во время стадии оптического разделения.

Пример 1. Конъюгат $\alpha_v\beta_3$ интегрин

Династрия (4S)-4,11-диэтил-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил-1-{{(2S)-2-(карбоксилатометил)-17-[4-{{[(1R)-2-карбоксилато-1-{3-[[3-[(пропилкарбамоил)амино]фенил]сульфонил)амино]фенил}этил]карбамоил}амино)анилино]-4,17-диоксо-7,10,13-триокса-3,16-диазагептадекан-1-оил}-L-пролил-L-валинат



40 мг (68 мкмоль) промежуточного соединения 4 и 48 мг (81 мкмоль) промежуточного соединения 5 растворяли в 6,4 мл DMF и добавляли 33,5 мг (88 мкмоль) HATU и 35 мкл DIEA. Смесь взбалтывали при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь выпаривали и оставшийся остаток очищали с помощью HPLC. Получали 28 мг (39%) защищенного промежуточного соединения.

LC-MS (способ 1): $R_t = 1,15$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 1047 ($M+H$)⁺.

28 мг данного промежуточного соединения растворяли в 2 мл дихлорметана. Добавляли 2 мл безводной трифторуксусной кислоты и смесь взбалтывали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем обрабатывали ультразвуком в течение 1 часа. После концентрирования в вакууме продукт лиофилизировали из смеси ацетонитрила/воды. Получали 30 мг (колич.) промежуточного соединения со снятой защитой в виде оранжевого твердого вещества.

LC-MS (способ 1): $R_t = 0,72$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 891 ($M+H$)⁺.

1900 мг (1,89 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 60 мл DMF, добавляли 1361 мг (1,89 ммоль) промежуточного соединения 6 и смесь взбалтывали в течение 2 часов при комнатной температуре. Раствор концентрировали в вакууме, оставшийся остаток обрабатывали водой и 5% лимонной кислотой и фильтровали. Оставшийся остаток растворяли в DCM/метаноле и добавляли диэтиловый эфир. Осадок фильтровали и очищали с помощью флэш-хроматографии со смесью элюентов DCM/метанола/ NH_4OH (17%) 15/2/0,2 -> 15/4/0,4. Соответствующие фракции собирали и концентрировали в вакууме. После сушки остатка в вакууме получали 942 мг (34%) указанного в названии соединения.

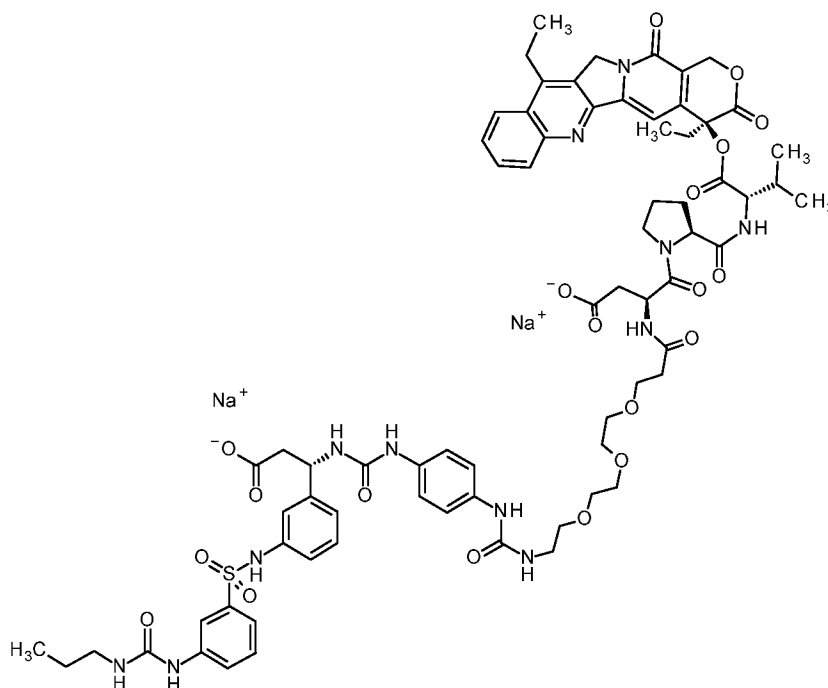
LC-MS (Способ 1): $R_t = 0,97$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 1471 (M+H)⁺.

20 мг (14 мкмоль) данного промежуточного соединения растворяли в 4 мл диоксана/воды 1:1, добавляли 30 мкл (30 мкмоль) 1 н. водного раствора гидроксида натрия, смесь обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут при комнатной температуре и лиофилизировали. Получали 21 мг (колич.) указанного в названии соединения.

LC-MS (способ 1): $R_t = 0,97$ минуты; MS (ESIpos): масса/заряд = 1471 (M- 2Na⁺ + 2H⁺ +H)⁺.

Пример 2. Эталонное соединение примера 1 (S-эпимер)

Динатрия (4S)-4,11-диэтил-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил-1-{{(2S)-2-(карбоксилатометил)-17-[4-({[(1S)-2-карбоксилато-1-{3-[(3-[(пропил-карбамоил)амино]фенил}сульфонил)амино]фенил}этил]карбамоил}амино)анилино]-4,17-диоксо-7,10,13-триокса-3,16-диазагептадекан-1-оил}-L-пролил-L-валинат



Данное соединение синтезировали по аналогии с примером 1 с использованием эпимера промежуточного соединения лиганда 7 α ,13.

Биологическое оценивание предпочтительного токсифора 7-этилкамптотетина и конъюгата примера 1

In vitro тесты для определения клеточной проницаемости

Caco-2

Клеточная проницаемость для вещества может быть исследована посредством тестирования *in vitro* в анализе переноса с использованием клеток Caco-2 [M.D. Troutman и D.R. Thakker, *Pharm. Res.* 20 (8), 1210-1224 (2003)]. Для этого клетки культивировали 15-16 суток на 24-луночных фильтровальных планшетах. Для определения проникновения соответствующее тестируемое вещество наносили в буфере HEPES на клетки либо апикально (А), либо базально (В) и инкубировали в течение 2 часов. Через 0 часов и через 2 часа отбирали образцы из цис- и транс-компарментов. Образцы разделяли с помощью HPLC (Agilent 1200, Böblingen, Germany) с использованием колонок с обращенной фазой. Систему HPLC подключали через интерфейс Turbo Ion Spray к масс-спектрометру Triple Quadropol API 4000 (AB SCIEX Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany). Проницаемость оценивали на основании значения P_{app} , которое рассчитывали по формуле, опубликованной Schwab et al. [Д. Schwab et al., *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725 (2003)]. Вещество классифицировали как активно транспортируемое, если отношение P_{app} (В-А) к P_{app} (А-В) (коэффициент эффлюкса) было > 2 или $< 0,5$.

В данном анализе токсифор (4S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-1Н-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14(4Н,12Н)-дион (7-этилкамптотецин), который использовали в конъюгате примера 1, демонстрировал очень хорошую проницаемость P_{app} А->В = 171 нм/с и низкий коэффициент эффлюкса, составляющий 1. Это выгодно отличается от профиля SN38, токсифора, высвобождаемого из иринотекана, который демонстрирует значительно более низкую проницаемость P_{app} А-> В = 8 нм/с и коэффициент эффлюкса, составляющий 36. Новые данные для SN38: проницаемость P_{app} А-> В = 20 нм/с и коэффициент эффлюкса 9.

Анализ Р-гликопротеина (p-GP)

Многие опухолевые клетки экспрессируют белки-переносчики лекарственных средств, и это часто сопровождается развитием устойчивости к цитостатическим средствам. Таким образом, вещества, которые не являются субстратами таких белков-переносчиков, такие как Р-гликопротеин (P-gr) или BCRP, например, могут проявлять улучшенный профиль активности.

Субстратные свойства вещества для P-gr (ABCB1) определяли посредством анализа переноса с использованием клеток LLC-PK1, которые надэкспрессируют P-gr (клетки L-MDR1) [A.H. Schinkel et al., *J. Clin. Invest.* 96, 1698-1705 (1995)]. Для этого клетки LLC-PK1 или клетки L-MDR1 культивировали на 96-луночных фильтровальных планшетах в течение 3-4 суток. Для определения проникновения соответствующее тестируемое вещество, отдельно или в присутствии ингибитора (такого как ивермектин или верапамил, например), наносили в буфере HEPES на клетки либо апикально (А), либо базально (В) и инкубировали

в течение 2 часов. Через 0 часов и через 2 часа отбирали образцы из цис- и транс-компарментов. Образцы разделяли с помощью HPLC с использованием колонок с обращенной фазой. Систему HPLC подключали через интерфейс Turbo Ion Spray к масс-спектрометру Triple Quadropol API 3000 (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Germany). Проницаемость оценивали на основании значения Papp, которое рассчитывали по формуле, опубликованной Schwab et al. [Д. Schwab et al., J. Med. Chem. 46, 1716-1725 (2003)]. Вещество классифицировали как субстрат P-гр, если коэффициент эффлюкса Papp (B-A) к Papp (A-B) составлял > 2 .

В данном анализе токсифор (4S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-1Н-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14(4Н,12Н)-дион (7-этилкамптотецин), который использовали в конъюгате примера 1, демонстрировал очень хорошую проницаемость $P_{app} A \rightarrow B = 196$ нм/с и низкий коэффициент эффлюкса, составляющий 0,6. Это выгодно отличается от профиля SN38, токсифора, высвобождаемого из иринотекана, который демонстрирует значительно более низкую проницаемость $P_{app} A \rightarrow B = 10$ нм/с и коэффициент эффлюкса, составляющий 16.

Цитотоксичность *in vitro* в отношении NCI-H1975 и их мутантов по функции переноса

На цитотоксическую активность 7-этилкамптотецина не влияла отрицательно трансфекция опухолевых клеток NCI-H1975 переносчиками лекарственных средств р-гликопротеина (P-гр) и белка, ассоциированного с лекарственной устойчивостью при раке молочной железы (BCRP), что сильно контрастирует с SN38.

Таблица 1. Цитотоксичность *in vitro* в отношении NCI-H1975 и их мутантов по функции переноса

Соединение	IC ₅₀ в отношении NCI-H1975 [нМ]	IC ₅₀ в отношении NCI-H1975-P-гр [нМ]	IC ₅₀ в отношении NCI-H1975-BCRP [нМ]
7Et-CPT	19	34	27
SN38	45	141	512

Тест связывания $\alpha_v\beta_3$

$\alpha_v\beta_3$ из клеток A375 человека очищали по аналогии с процедурой, описанной Wong et al. в Molecular Pharmacology 50, 529-537 (1996). В каждом случае 10 мкл $\alpha_v\beta_3$ (5 нг) в TBS при pH 7,6, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1% н-октилглюкопиранозида (Sigma); 10 мкл тестируемого вещества в TBS при pH 7,6, 0,1% DMSO и 45 мкл TBS при pH 7,6, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. В каждом случае затем добавляли 25 мкл гранул WGA SPA (Amersham, 4 мг/мл) и 10 мкл эхистатина (0,1 мКи, Amersham, меченного хлорамином-Т). После 16 часов при комнатной

температуре образцы измеряли на устройстве для измерения сцинтилляции (Wallac 1450). Результаты теста представлены в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Значения IC_{50} связывания с $\alpha_v\beta_3$ рецептором

Пример	IC_{50} [нМ]
1	29
2	700

Расщепляемость эластазой

Цитотоксичность *in vitro* в присутствии и в отсутствие эластазы

Культивирование клеток проводили согласно стандартным процедурам со средой, рекомендованной поставщиком. Клетки в общем объеме 100 мкл высевали в 96-луночный планшет с белым дном (№ 3610). После 24-часового инкубационного периода при 37°C и 5% CO_2 среду заменяли добавлением 90 мкл свежей среды. Обработку начинали с добавления тестируемого соединения к клеткам в 10 мкл культуральной среды. Выбирали концентрации от 10^{-5} М до 10^{-13} М в трех повторностях с последующей инкубацией при 37°C и 5% двуокиси углерода. Один набор образцов обрабатывали только тестируемым соединением, тогда как во второй набор образцов, подвергнутых идентичной обработке, также пипеткой добавляли 10 нМ эластазы. Через 72 часа пролиферацию определяли с использованием анализа МТТ (АТСС). В конце периода инкубации реагент МТТ добавляли ко всем образцам на 4 часа с последующим лизисом клеток путем добавления детергента. Образовавшийся краситель выявляли при 570 нм. Пролиферацию клеток, которые не обрабатывали тестируемым веществом, но в остальном обрабатывали идентично, определяли как 100% значение. Кривая доза-ответ позволяет определить соответствующие значения IC_{50} , которые сведены в таблицу 3. (фиг. 1 и таблица 4).

Таблица 3. Краткое описание значений IC_{50} примеров 1 и 2 с наличием эластазы и без таковой

Пример	IC_{50} в отношении линии клеток 786-О [нМ]		IC_{50} в отношении линии клеток HT29 [нМ]	
	без эластазы	с эластазой	без эластазы	с эластазой
1	188	1,1	245	8,7
2	268	0,17	>500	32

Таблица 4. Значения IC₅₀ соединения примера 1 и примера 1 из EP 1238678 с эластазой и без таковой при параллельном сравнении (использовали эластазу с более высокой ферментативной активностью)

Пример	IC ₅₀ в отношении линии клеток 786-О [нМ]		Фактор специфичности
	без эластазы	с эластазой	
1	28	0,17	165
1/EP 1238678	63	1,7	37

Присутствие нейтрофильной эластазы вызывает значительное улучшение цитотоксичности соединения с использованием линии клеток рака почки 786-О. Соединения также обнаруживают выраженную зависимость от эластазы при использовании линии клеток рака толстой кишки HT29. Опять таки индуцированное эластазой расщепление вызывает резкое усиление цитотоксического эффекта соединения.

Растворимость конъюгата в примере 1 по сравнению с конъюгатом примера 1 из EP 1238678

Способ. Для каждой среды-носителя, подлежащей тестированию, 0,5-1,0 мг тестируемого соединения отвешивали в 2-мл сосуде Эппендорфа. Добавляли 2-3 стеклянные бусины (Ø 3 мм) и 1,0 мл среды-носителя. Сосуд встряхивали при 1400 об./минута в течение 24 часов при комнатной температуре (25°C). После данного периода времени надосадочную жидкость (приблизительно 230 мкл) переносили в центрифужную пробирку. Через 30 минут при 42000 об./минута растворенное вещество переносили в другой сосуд и разбавляли с помощью DMSO (1:5 и 1:50). Эти два разбавления анализировали с помощью HPLC (считывание: площадь).

Способ HPLC

Элюент А: 1 мл трифторуксусной кислоты/л воды.

Элюент В: 1 мл трифторуксусной кислоты/л ацетонитрила.

Градиент

Время [минуты]	А [%]	В [%]	Поток: [мл/минута]
0,0	98	2	1,5
0,2	98	2	1,5
3,3	10	90	1,5
4,0	10	90	1,5
4,1	98	2	2,5
4,7	98	2	2,5

5,0 98 2 1,5

Колонка: ZORBAX Extend-C18, 3,0 × 50 мм, 3,5 мкм.

Температура термостата: 30°C.

Выявление: 214 и 254 нм.

Вводимый объем: 20 мкл.

Для количественного определения строили калибровочную кривую из раствора DMSO тестируемого соединения (100 мкл/мл, 20 мкг/мл и 2,5 мкг/мл) с использованием того же способа HPLC.

Таблица 5. Растворимость соединения примера 1 и примера 1 из EP 1238678

Соединение	5% D-Маннит	0,9% NaCl в H ₂ O
Пример 1	> 500 мг/мл	465
Пример 1 из EP 1238678	200 мг/мл	200

Стабильность в буфере на основе лимонной кислоты при pH 4 конъюгата примера 1 по сравнению с конъюгатом примера 1 из EP 1238678

Способ. Растворяли 0,15 мг тестируемого соединения в 0,1 мл диметилсульфоксида и 0,4 мл ацетонитрила. Для полного растворения сосуд для HPLC с раствором образца встряхивали и обрабатывали ультразвуком. Затем добавляли 1,0 мл соответствующего буферного раствора (цитратный буфер с pH 4; лимонная кислота/гидроксид натрия/хлорид натрия, Fluka 33643) и образец откручивали на вортексе. Раствор образца анализировали с помощью HPLC для определения количества тестируемого соединения и до двух побочных продуктов в конкретное время (0, 1, 2, 4, 24 часа) в течение 24 часов при 37°C. Значения t(0) получали для образца, взятого сразу после откручивания на вортексе с буфером при комнатной температуре. Площади пиков (в процентах) использовали для количественной оценки.

Анализ чистоты с помощью LC и LC/MS. Исходный материал анализировали на предмет чистоты с помощью LC; через 24 часа образец дополнительно анализировали с помощью LC/MS (Waters Quattro Micro).

Условия HPLC	Agilent
DAD	G4212B
Колоночный термостат	G1316C
Термостат	G1330B

Автоматический пробоотборник	G1367E
Двойной насос	G1312B

Элюент	A = 1 мл муравьиной кислоты/л воды; B = 1 мл муравьиной кислоты/л ACN			Градиент	Время (минута)	A (%)	B (%)	Поток (мл/минута)
Колонка	Nucleodur 100 C18 ec 3 мкм, 50*2 мм				0,0	98	2	0,75
Температура	37	°C			1,0	98	2	0,75
Выявление	214	нм			15,0	5	95	0,75
Поток	0,75	мл/минута			17,5	5	95	0,75
Вводимый объем	8	мкл			17,7	98	2	1,50
					18,2	98	2	1,50
					18,5	98	2	1,00
					19,0	98	2	0,75

Таблица 6. Стабильность соединения примера 1 и примера 1 из EP 1238678 в буфере на основе лимонной кислоты при pH 4

Соединение	4 часа	24 часа
Пример 1	100%	95%
Пример 1 из EP 1238678	100%	74%

Стабильность в плазме конъюгата примера 1

Измерение высвобождения исходного соединения в плазме крысы

1 мг тестируемого соединения примера 1 растворяли в смеси 1,5 мл диметилсульфоксида и 1 мл воды. Для полного растворения сосуд для HPLC встряхивали и обрабатывали ультразвуком. Затем добавляли 500 мкл этого раствора в 0,5 мл плазмы крысы с откручиванием на вортексе при температуре 37°C. Отбирали аликвоты (каждая 10 мкл) в соответствующие моменты времени и анализировали с помощью HPLC для определения количества тестируемого соединения. Все данные приведены как процент площади начального соединения в t₀.

Соединение примера 1 является стабильным в плазме крысы на протяжении > 24 часов.

Стабильность 7-этилкамптотецина (токсофора примера 1) и камптотецина (токсофора примера 1 из EP 1238678) в человеческой плазме

Растворяли 1 мг тестируемого соединения в 0,5 мл ацетонитрила/диметилсульфоксида 1:1. Для полного растворения сосуд для HPLC встряхивали и обрабатывали ультразвуком. При откручивании на вортексе 20 мкл данного раствора добавляли в 1 мл нагретой до 37°C плазмы. После 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2 и 4 часов ферментативную реакцию останавливали путем добавления 100 мкл раствора соединения в плазме в сосуд, содержащий 300 мкл ацетонитрила/буфера с pH 3 (80:20) при комнатной температуре. Смесь центрифугировали при 5000 об./минута в течение 10 минут. Надосадочную жидкость анализировали с помощью HPLC для определения количества тестируемого соединения и до двух побочных продуктов. Значения $t(0)$ получали из обработанного образца, взятого сразу после откручивания на вортексе с плазмой при комнатной температуре. Площади пиков (в процентах) использовали для количественной оценки.

В условиях анализа 7-этилкамптотецин является стабильным в течение по меньшей мере 4 часов, в то время как камптотецин разлагается на приблизительно 50%.

Фармакокинетические показатели

Растворяли 4 мг конъюгата примера 1 в солевом растворе и вводили внутривенно самкам несущих опухоль 786-О мышей NMRI nu/nu. Собирали образцы опухоли и плазмы в различные моменты времени и определяли содержания интактного конъюгата и токсофора 7-этилкамптотецина, отщепленного от конъюгата.

Для сравнения 1 мг/кг 7-этилкамптотецина растворяли в смеси 5% водной декстрозы/солютола/DMSO 85/10/5 и вводили внутривенно самкам несущих опухоль 786-О мышей NMRI nu/nu. Снова собирали образцы опухоли и плазмы в различные моменты времени и определяли содержания 7-этилкамптотецина.

Наконец, для сравнения 4 мг эпимерного эталонного конъюгата примера 23 (со слабой аффинностью связывания $\alpha_v\beta_3$) растворяли в солевом растворе и вводили внутривенно самкам несущих опухоль 786-О мышей NMRI nu/nu. Собирали образцы опухоли и плазмы в различные моменты времени и определяли содержания интактного конъюгата и токсофора 7-этилкамптотецина, отщепленного от конъюгата.

В таблице 4 кратко описаны отношения содержания 7-этилкамптотецина в опухоли к содержанию в плазме, выявляемые в каждом из этих экспериментов. Показана улучшенная доставка 7-этилкамптотецина в опухоль посредством конъюгата $\alpha_v\beta_3$ интегрин по сравнению с прямым введением токсофора и с введением слабо связывающего эпимерного контрольного конъюгата.

Таблица 4

Вводимое соединение	Отношение содержания 7-этилкамптотецина в опухоли к содержанию в плазме	Фактор обогащения в опухоли/плазме (отношение/отношение)
Пример 1	6,5	10,8
Пример 2 (эталон)	1,2	2
7-этилкамптотецин	0,6	1

In vivo исследования с помощью ксенотрансплантации

Противоопухолевые активности соединения примера 1 исследовали на мышинных моделях ксенотрансплантации рака человека. С этой целью иммунокомпрометированным мышам подкожно имплантировали опухолевые клетки или фрагменты опухоли. При среднем размере опухоли 20-40 мм² животных рандомизировали в получающие лечение и контрольные группы (n = 8 животных/группа) и лечение начинали со среды-носителя отдельно или соединения примера 1 (состав: забуференный фосфатом солевой раствор («PBS»); путь применения: внутривенно в хвостовую вену («i.v.»)). Внутривенное лечение осуществляли на протяжении трех последовательных суток один раз в сутки с последующими четырех-суточными лекарственными каникулами без лечения. Размер опухоли и массу тела определяли по меньшей мере один раз в неделю. Площадь опухоли определяли с помощью электронного штангенциркуля [длина (мм) × ширина (мм)]. Экспериментальные группы закрывали, когда группа достигла заранее определенной этической конечной точки на основании немецких и европейских нормативных правил защиты животных. Противоопухолевую эффективность *in vivo* представляли как отношение Т/С средней площади опухоли, измеренной для получающей лечение и контрольной группы в последние сутки, когда получающий среду-носитель контроль оставался в исследовании (лечение/контроль; средняя площадь опухоли в получающей лечение группе/средняя площадь опухоли в контрольной группе). Соединение, имеющее Т/С ниже 0,5, определяли как активное (т. е. эффективное). Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения SigmaStat. Проводили однофакторный дисперсионный анализ и различия с контролем сравнивали с помощью процедуры попарного сравнения (способ Данна).

Результаты

Соединение примера 1 демонстрировало мощную противоопухолевую эффективность на различных моделях ксенотрансплантата опухолей человека при

монотерапии. В частности, соединение примера 1 было эффективным в снижении площади опухоли на модели рака молочной железы, толстой кишки, легкого и почки.

Таблица 5. Противоопухолевая активность соединения примера 1 на различных моделях ксенотрансплантата рака человека у мышей

Модель ксенотрансплантата	Клеточная линия, выделенная у больного с	Соединение	Доза и схема	T/C
MX1	раком молочной железы	примера 1	36 мг/кг 3 суток с введением, 4 суток без введения, 3 цикла	0,03*
SW-480	раком толстой кишки	примера 1	36 мг/кг 3 суток с введением, 4 суток без введения, 3 цикла	0,1*
NCI-H69	раком легкого	примера 1	40 мг/кг 3 суток с введением, 4 суток без введения, 3 цикла	0,06*
786-O	раком почки	примера 1	36 мг/кг 3 суток с введением, 4 суток без введения, 3 цикла	0,19*

* $P < 0,05$ (по сравнению с обрабатываемым средой-носителем контролем).

T/C = отношение средней площади опухоли в получающей лечение группе по сравнению со средней площадью опухоли в контрольной группе в последние сутки, когда контрольная группа оставалась в исследовании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)

СТ – LI – SP – IA (I),

в которой

СТ представляет собой одновалентный радикал из группы цитотоксического радикала, радикала цитостатического средства и радикала производного цитостатического средства, каждый из которых может дополнительно нести гидроксильную, карбоксильную или аминогруппу;

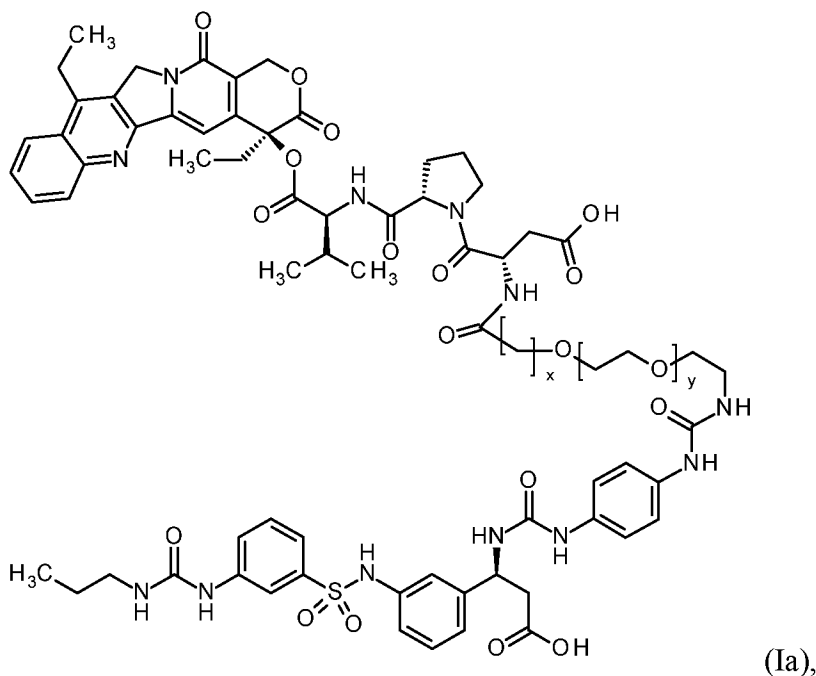
LI представляет собой двухвалентный пептидный радикал формулы -L-Val-L-Pro-L-Asp-;

SP представляет собой группу формулы $-C=O-(CH_2)_x-O-(CH_2-CH_2-O)_y-CH_2-CH_2-(NH)_z-C=O-$, при этом $x = 1-5$, $y = 0-15$, и $z = 0-1$;

IA представляет собой одновалентный радикал, направляющий на рецептор $\alpha_v\beta_3$ интегрин;

и его соли, сольваты и сольваты солей.

2. Соединение общей формулы (Ia)



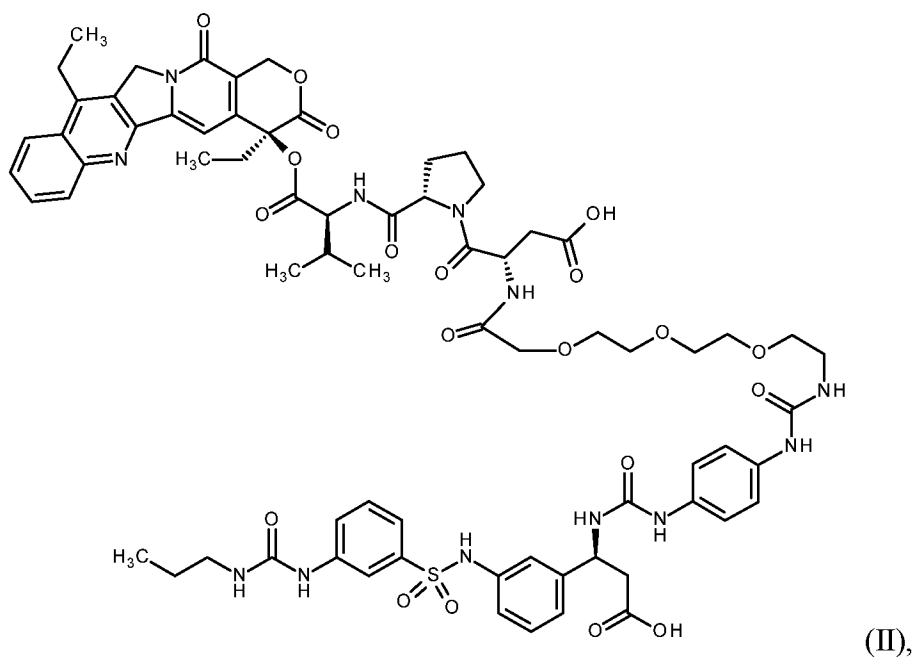
в которой x равняется 1-5, и $y = 0-15$,

и его соли, сольваты и сольваты солей.

3. Соединение по пп. 1 или 2, при этом $x = 1-4$, и $y = 0-10$.

4. Соединение по любому из пп. 1-2, при этом $x = 1-2$, и $y = 0-5$.

5. Соединение формулы (II)



и его соли, сольваты и сольваты солей.

6. Соединение по п. 5 в форме его динатриевой соли.

7. Соединение по любому из пп. 1-6 для лечения и/или предупреждения заболеваний.

8. Соединение по любому из пп. 1-6 для лечения и/или предупреждения гиперпролиферативных нарушений.

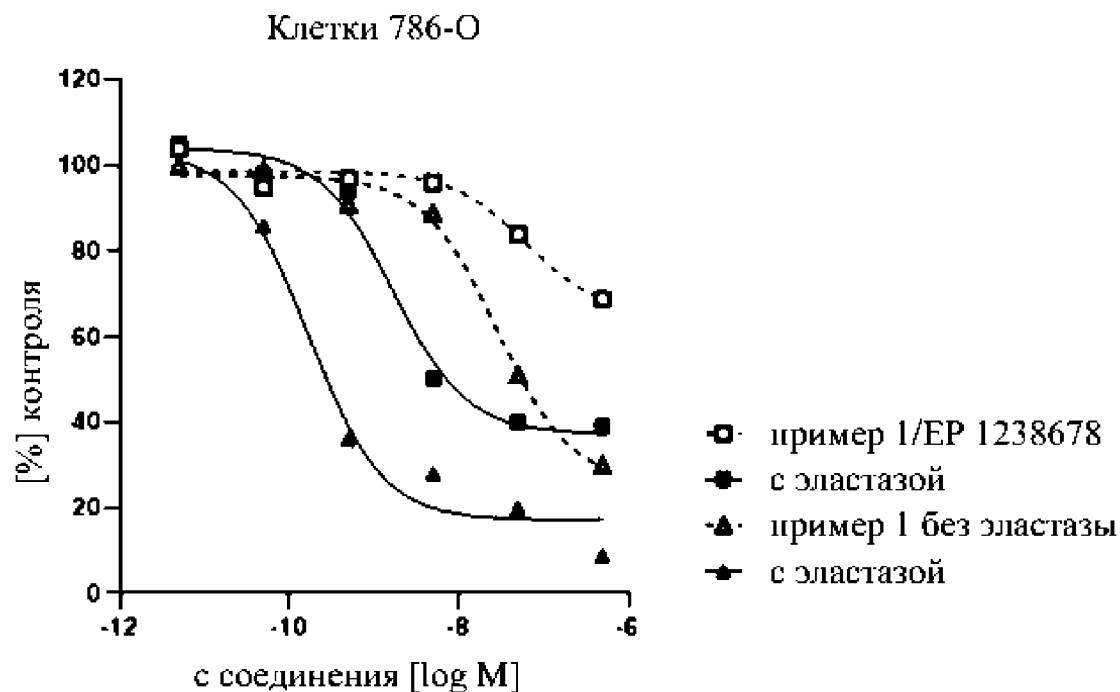
9. Применение соединения по любому из пп. 1-6 для получения лекарственного препарата для лечения и/или предупреждения гиперпролиферативных нарушений.

10. Лекарственное средство, содержащее соединение по любому из пп. 1-6 в комбинации с одним или более инертными, нетоксическими, фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами.

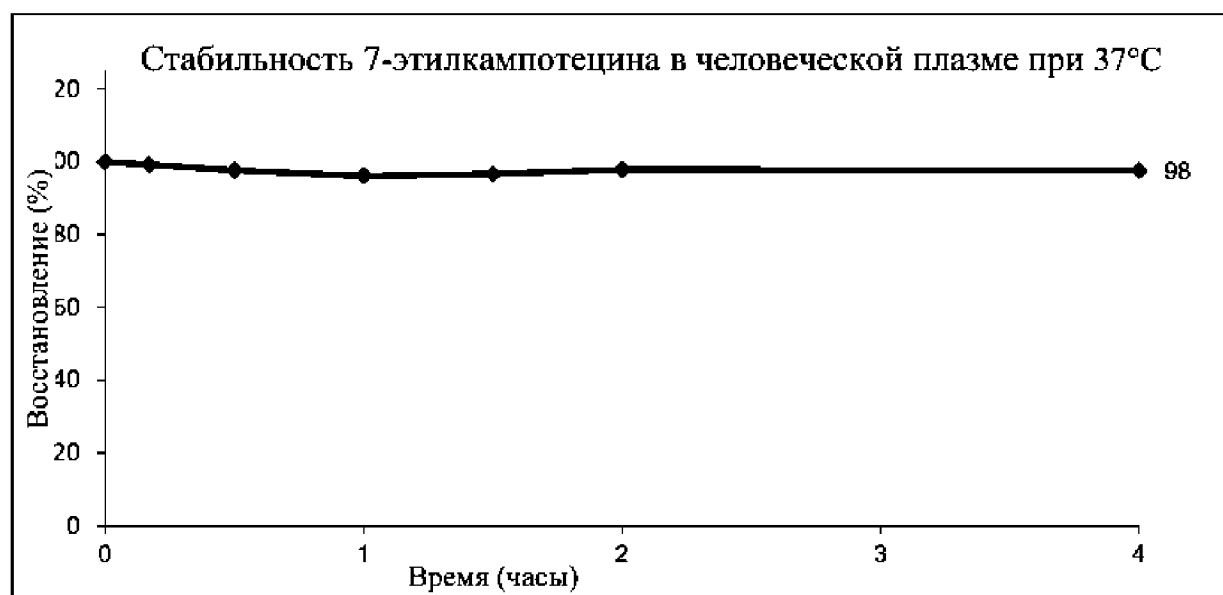
11. Лекарственное средство по п. 10 для лечения и/или предупреждения гиперпролиферативных нарушений.

12. Способ лечения и/или предупреждения офтальмологических нарушений и раковых заболеваний или опухолей у людей и животных путем введения эффективного количества по меньшей мере одного соединения по любому из пп. 1-6 или лекарственного средства по любому из пп. 10-11.

Фиг. 1. Кривая доза-ответ примера 1 по сравнению с примером 1 из EP1 238678 с использованием линии клеток рака почки 786-О с обработкой эластазой и без таковой



Фиг. 2. Стабильность 7-этилкампотецина человеческой плазме при 37°C



Фиг. 3. Стабильность кампотецина в человеческой плазме при 37°C

