



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113830** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)**C07K 14/47** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61K 47/50** (2017.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2010 14267**
- (22) Дата подання заявки: **30.04.2009**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.03.2017**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/049,291, 61/147,966**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **30.04.2008, 28.01.2009**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **25.02.2011, Бюл.№ 4**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.03.2017, Бюл.№ 6**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2009/042267, 30.04.2009**
- (72) Винахідник(и):  
**Чарі Раві В. Дж. (US),  
Чжао Роберт Юнсінь (US),  
Ковтун Єлена (US),  
Сінгх Раджіва (US),  
Уїдсон Вейн Чарлз (US)**
- (73) Власник(и):  
**ІМ'ЮНОДЖЕН, ІНК.,  
830 Winter Street, Waltham, MA 02451, United States of America (US)**
- (74) Представник:  
**Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
GUILLAUME CLAVÉ ET AL., "A novel heterotrifunctional peptide-based cross-linking reagent for facile access to bioconjugates. Applications to peptide fluorescent labelling and immobilisation", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, (20080101), vol. 6, no. 17, doi:10.1039/b807263a, ISSN 1477-0520, PAGE 3065  
OLIVIER PLOUX ET AL., "A new modified amino acid. 2-Amino-3-mercapto-3-phenylpropionic acid (3-mercaptophenylalanine). Synthesis of derivatives, separation of stereoisomers, and assignment of absolute configuration", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, (19880701), vol. 53, no. 14, doi:10.1021/jo00249a006, ISSN 0022-3263, PAGE 3154 - 3158  
CHARI ET AL., "Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy.", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, (1998), vol. 31, PAGE 89 - 104  
US 5 219 564 A, 15.06.1993  
US 2006/0233814 A1, 19.10.2006  
US 2005/158370 A1, 21.07.2005  
GB 2 029 825 A, 26.03.1980  
EP 1 514 561 A1, 16.03.2005  
EP 0 457 250 A2, 21.11.1991  
US 2007/092940A1, 26.04.2007  
US 2004/001838 A1, 01.01.2004  
WO 98/13059 A1, 02.04.1998  
ZARA J J ET AL., "A carbohydrate-directed heterobifunctional cross-linking reagent for the synthesis of immunoconjugates", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 194, no. 1, doi:10.1016/0003-2697(91)90163-N, ISSN 0003-2697, (19910401), PAGE 156 - 162  
YASHVEER SINGH ET AL., "A novel heterobifunctional linker for facile access to bioconjugates", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, (20060101), vol. 4, no. 7, doi:10.1039/b518151h, ISSN 1477-0520, PAGE 1413  
SENGLE G ET AL., "Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 8, no. 6, ISSN 0968-0896, (20000601), PAGE 1317 - 1329

UA 113830 C2

**(54) ЗШИВАЮЧІ РЕАГЕНТИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується заряджених зшиваючих реагентів або їх попередників, кон'югатів клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами, які містять заряджені лінкери або пролінкери, і способів їх отримання.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід має відношення до синтезу нових заряджених зшиваючих реагентів (cross-linkers) і таких зшиваючих реагентів, які можуть бути підданими обробці в клітинах мішені з утворенням заряджених молекул. Даний винахід також стосується способів отримання кон'югатів клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами, які передбачають модифікування клітинозв'язувальних речовин цими зшиваючими реагентами з подальшою реакцією з препаратами або модифікування лікарських препаратів цими зшиваючими реагентами з подальшою реакцією з клітинозв'язувальними речовинами. Покращений спосіб отримання кон'югатів забезпечує можливість приєднання більшого числа молекул препарату до клітинозв'язувальної речовини, що призводить до більшої активності і надає кон'югатам більшої водорозчинності.

Рівень техніки

Біфункціональний модифікуючий реагент N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо) пропіонат (SPDP) застосовується для сполуки двох білків через дисульфідний зв'язок. Реагент вступає в реакцію з першим білком і вводить активну групу, яка містить дисульфід, на стадії модифікації. Потім надається другий білок, який містить вільну тіолову групу, утворюючи дисульфідний зв'язок між двома білками на стадії кон'югації. Описано багато похідних SPDP і імідних версій SPDP (U.S. Patent 4,563,304; Carlsson J. et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Goff D.A. and Carroll S.F., 1 BioConjugate Chem. 381-386 (1990); Delprino L. et al., 82 J. Pharm. Sci. 506-512 (1993); Arpicco S. et al., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997)).

Були описані кон'югати клітинозв'язувальних речовин з високоцитотоксичними препаратами (U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064, 5,475,092, 5,585,499, 6,436,931, 6,372,738 and 6,340,701; Chari R.V.J. et al., 52 Cancer Res. 127-131 (1992)). У цих кон'югатів спочатку проводиться модифікація клітинозв'язувальної речовини за допомогою біфункціонального реагенту типу SPDP, SPP або SMCC для введення активного дисульфідного або малеїмідного угруповання. А реакція з цитотоксичним лікарським препаратом, який містить тіол, дає кон'югат, в якому клітинозв'язувальна речовина типу моноклонального антитіла і лікарський препарат з'єднуються через дисульфідні зв'язки або тіоефірні зв'язки.

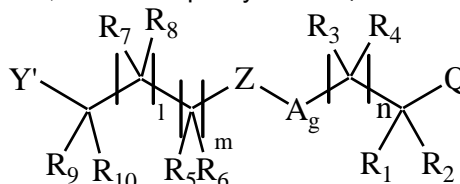
Були описані гетеробіфункціональні зшиваючі реагенти, які містять нітропіридилтіо-, N,N-диалкілкарбоксамідопіридилтіо- або ди-(N,N-диалкілкарбоксамідо) піридилтіогрупу і реакційноздатну ефірну групу карбонової кислоти типу складноефірної групи N-сукцинімідилу або N-сульфосукцинімідилу (U.S. Patent No. 6,913,748). Стверджується, що присутність N-сульфосукцинімідильної групи надає цим зшиваючим реагентам більшої водорозчинності. Проте, як тільки клітинозв'язувальна речовина прореагує з цими зшиваючими реагентами, N-сульфосукцинімідильна група витісняється, і перевага в розчинності втрачається, як у модифікованій клітинозв'язувальній речовині, так і у її кон'югата з лікарським препаратом. Оскільки цитотоксичні лікарські препарати, які використовуються в кон'югатах клітинозв'язувальних речовин з препаратами, часто є вельми важкорозчинними у водних розчинах, то буває важко приєднати достатнє число молекул препарату до клітинозв'язувальної речовини і при цьому зберегти водорозчинність. Крім того, реакції доводиться проводити в розбавлених розчинах, що є незручним для розширення виробництва внаслідок необхідності використовувати великі об'єми розчину.

Сутність винаходу

Даним винаходом запропоновані заряджені зшиваючі реагенти (лінкери), у яких заряд зберігається як після модифікації клітинозв'язувальної речовини, так і в кон'югаті, який утворюється з лікарським препаратом. Зокрема, даний винахід стосується застосування заряджених лінкерів для сполуки препаратів з клітинозв'язувальною речовиною (напр., антитілом). У одному аспекті винаходу заряджені лінкери застосовуються для модифікації клітинозв'язувальних речовин і сполуки їх з препаратами. У іншому аспекті винаходу заряджені лінкери застосовуються для модифікації лікарських препаратів і сполуки їх з клітинозв'язувальними речовинами. У наступному аспекті винаходу заряджені лінкери застосовуються для одночасного сполуки лікарських препаратів з клітинозв'язувальними речовинами. У всіх випадках бажаним кінцевим результатом є кон'югат типу препарат-заряджений лінкер-клітинозв'язувальна речовина, який можна представити формулою  $CB(-L^c-D)_q$ , де CB позначає клітинозв'язувальну речовину,  $L^c$  – заряджений лінкер, D – молекула препарату, а q – ціле число від 1 до 20. Наявність заряджених груп у лінкера в кон'югаті клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом дає ряд переваг, як то i) більшу водорозчинність кінцевого продукту, ii) можливість працювати за вищої концентрації у водних розчинах, iii) можливість приєднати більше число молекул препарату до однієї молекули клітинозв'язувальної речовини, що призводить до більшої активності, iv) можливість для

зарядженого кон'югата зберігатися усередині клітин мішені, що веде до більшої активності, і v) поліпшення чутливості клітин з множинною лікарською стійкістю, які не зможуть виводити заряджені молекули препарату з клітини. У винаході також описані лінкери, які можна кон'югувати з лікарським препаратом і клітинозв'язувальною речовиною і отримати кон'югат, який може бути піддано метаболізму в клітині з утворенням метаболіту, який несе препарат, і містить одне або декілька заряджених угруповань. Такі лінкери надалі іменуються попередниками заряджених лінкерів (пролінкерами). Ті угруповання лінкера, які стануть зарядженими після клітинної обробки, надалі іменуються попередниками заряджених угруповань.

У одному аспекті даного винаходу заряджений зшиваючий реагент або попередник зарядженого лінкера представлені формулою (I), в якій Y' може реагувати з клітинозв'язувальною речовиною, а Q може реагувати з цитотоксичним лікарським препаратом:



(I)

де: Y' позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість реакції з клітинозв'язувальною речовиною;

Q позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість приєднання цитотоксичного лікарського препарату через дисульфідний, тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, ефірний, складноефірний, карбаматний або амідний зв'язок;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю, аніони типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, катіони типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, або феніл, причому:

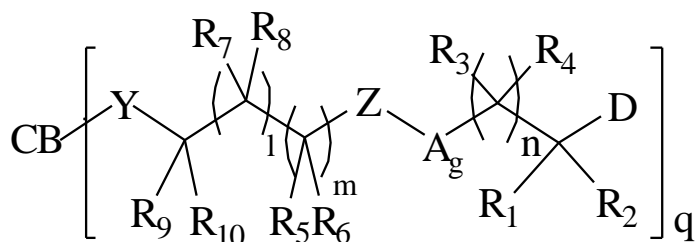
R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>13</sub> є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

A позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний з аніонів типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, де X має ті ж значення, що і вище, а g = 0 або 1;

Z позначає необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, або ланку F1-E1-P-E2-F2, в якій E1 і E2 є однаковими або різними і позначають C=O, O або NR<sub>14</sub>, де R<sub>14</sub> позначає H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 20 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, за умови, що якщо Z не є F1-E1-P-E2-F2, то щонайменше один з R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником, а якщо g = 1, то щонайменше один з A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником.

У іншому аспекті даного винаходу передбачений кон'югат клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом формули (II), в якому клітинозв'язувальна речовина СВ і препарат D прореагували на двох кінцях зарядженого зшиваючого реагенту або його попередника:



(II)

де: СВ позначає клітинозв'язувальну речовину;

5 D позначає лікарський препарат, сполучений з клітинозв'язувальною речовиною дисульфідним, тіоефірним, складнотіоефірним, пептидним, гідразоновим, ефірним, складнотіоефірним, карбаматним або амідним зв'язком;

10 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю, аніони типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, катіони типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, або феніл, причому:

15 R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>13</sub> є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

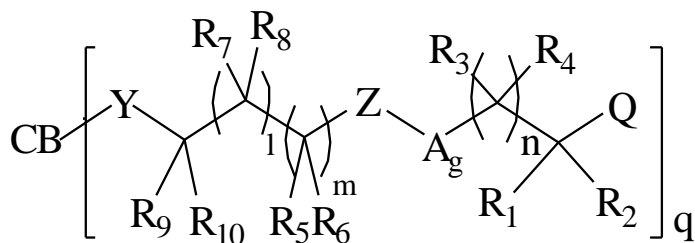
l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

20 A позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний з аніонів типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, де X має ті ж значення, що і вище, а g = 0 або 1;

25 Z позначає необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, або ланку F1-E1-P-E2-F2, в якій E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O, O або NR<sub>14</sub>, де R<sub>14</sub> позначає H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 20 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, за умови, що якщо Z не F1-E1-P-E2-F2, то щонайменше один з R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником, а якщо g = 1, то щонайменше один з A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником;

30 Y позначає карбонільну, тіоефірну, амідну, дисульфідну або гідразонову групу; а q позначає ціле число від 1 до 20.

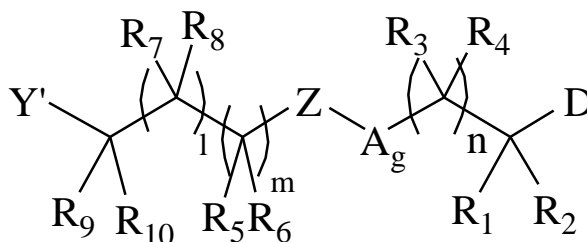
35 У наступному аспекті даного винаходу запропонована модифікована клітинозв'язувальна речовина формули (III), в якій клітинозв'язувальна речовина СВ прореагувала із зшиваючим реагентом, який все ще містить групу Q, здатну реагувати з цитотоксичним лікарським препаратом:



(III)

де замісники вже визначені вище.

У наступному аспекті даного винаходу передбачений модифікований лікарський препарат формули (IV), в якому препарат D прореагував із зшиваючим реагентом, який все ще містить групу Y', здатну реагувати з клітинозв'язувальною речовиною:



(IV)

де замісники вже визначені вище.

Далі даний винахід стосується способу отримання кон'югата клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом формули (II), в якому препарат з'єднується з клітинозв'язувальною речовиною через заряджений лінкер або пролінкер.

Даний винахід також стосується способу отримання модифікованої клітинозв'язувальної речовини формули (III), в якій клітинозв'язувальна речовина піддається реакції із зарядженим лінкером або пролінкером.

Даний винахід також стосується способу отримання модифікованого лікарського препарату формули (IV), в якому лікарський препарат піддається реакції із зарядженим лінкером або пролінкером.

Даний винахід охоплює і композиції (напр., фармацевтичні композиції), включаючи кон'югати або їх похідні (і/або їх сольвати, гідрати і/або солі) і носій (фармацевтично прийнятний носій).

Даний винахід також охоплює композиції (напр., фармацевтичні композиції), включаючи кон'югати або їх похідні (і/або їх сольвати, гідрати і/або солі) і носій (фармацевтично прийнятний носій), які додатково містять другий терапевтичний засіб. Дані композиції можуть бути застосовані для інгібування аномального росту клітин або лікування проліферативних захворювань у ссавців (напр., людини).

Даний винахід охоплює і спосіб інгібування аномального росту клітин або лікування проліферативних захворювань у ссавців (напр., людини), який передбачає введення даному ссавцеві терапевтично ефективної кількості кон'югатів або їх похідних (і/або їх сольватів і солей) або композиції, яка їх містить, окремо або в комбінації з іншим терапевтичним засобом.

Сполуки даного винаходу, їх похідні або їх кон'югати, а також композиції, які їх містять, придатні для лікування або зменшення тяжкості таких захворювань, які характеризуються аномальним ростом клітин (напр., раки). Інші застосування сполук або кон'югатів даного винаходу включають лікування остеопорозу, депресії, тривоги, стресу, фобій, паніки, дисфорії, психіатричних захворювань і болю, або як протиепілептичні, антибактеріальні засоби, діуретики, гіпотензивні, гіполіпідемічні засоби і антидепресанти.

Короткий опис креслень

На Фіг. 1 представлений синтез сульфованих зшиваючих реагентів, які містять нітропіридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу. Спочатку складні ефіри гідроксиалканоатів перетворюються на складні ефіри дибромалканоатів, як показано, після чого відбувається перетворення  $\alpha$ -бромзаміщеної сполуки на сульфонову кислоту.

На Фіг. 2 представлений синтез сульфованих зшиваючих реагентів, які містять піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу.

На Фіг. 3, 4 і 5 представлені різні шляхи синтезу заряджених зшиваючих реагентів, які несуть, реакційноздатну, ефірну групу і малеїмідний замісник, який сприяє приєднанню через тіоефірні зв'язки.

На Фіг. 6 і 7 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, які містять піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу.

На Фіг. 8 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, які містять нітропіридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу.

На Фіг. 9 і 10 представлені різні шляхи синтезу фосфатованих заряджених зшиваючих реагентів, які несуть, реакційноздатну, ефірну групу і малеїмідний замісник, який сприяє приєднанню через тіоефірні зв'язки.

На Фіг. 11 представлений синтез сульфованих зшиваючих реагентів, при якому сульфозамісник приєднується через розгалужену алкільну групу. Ці реагенти також містять піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу.

На Фіг. 12 представлений синтез сульфованих зшиваючих реагентів, при якому сульфозамісник приєднується через розгалужену алкільну групу. Ці реагенти також містять реакційноздатну ефірну групу і малеїмідну групу, яка сприяє приєднанню через тіоефірні зв'язки.

На Фіг. 13 представлений синтез зшиваючих реагентів, які містять четвертинний амін, і які несуть піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу.

На Фіг. 14 представлений синтез зшиваючих реагентів, які містять четвертинний амін, які несуть, реакційноздатну ефірну групу і малеїмідний замісник, який сприяє приєднанню через тїоефірні зв'язки.

На Фіг. 15 представлений синтез сульфонованих зшиваючих реагентів, які містять піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу. У цих сполуках сульфозамісник знаходиться на атомі вуглецю в  $\beta$ -положенні відносно ефірної групи.

На Фіг. 16 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, які містять піридилдисульфідну групу і реакційноздатну ефірну групу. У цих сполуках фосфатний замісник знаходиться в  $\beta$ -положенні відносно ефірної групи.

На Фіг. 17, 18 і 19 представлений синтез різних сульфонованих зшиваючих реагентів, які містять ланцюг поліетиленгліколю (PEG) разом з нітропіридилдисульфідною групою і реакційноздатною ефірною групою.

На Фіг. 20 і 21 представлений синтез різних сульфонованих зшиваючих реагентів, які містять ланцюг поліетиленгліколю (PEG) разом з малеїмідною групою і реакційноздатною ефірною групою.

На Фіг. 22 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, при якому фосфатний замісник приєднується через ароматичну групу. Ці реагенти також несуть реакційноздатну ефірну групу і нітропіридилдитіогрупу, яка сприяє приєднанню через дисульфідні зв'язки.

На Фіг. 23 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, при якому фосфатний замісник приєднується через розгалужену алкільну групу. Ці реагенти також несуть реакційноздатну ефірну групу і нітропіридилдитіогрупу, яка сприяє приєднанню через дисульфідні зв'язки.

На Фіг. 24-31 представлений синтез сульфонованих зшиваючих реагентів, які також включають гідразидну групу, яка сприяє приєднанню через кислотолабільні зв'язки.

На Фіг. 32-36 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, які також включають гідразидну групу, яка сприяє приєднанню через кислотолабільні зв'язки.

На Фіг. 37-38 представлений синтез зшиваючих реагентів, які містять четвертинний амін, які також несуть гідразидну групу, яка сприяє приєднанню через кислотолабільні зв'язки.

На Фіг. 39-42 представлений синтез заряджених зшиваючих реагентів, які також включають групу поліетиленгліколю (PEG).

На Фіг. 43-44 представлений синтез фосфатованих зшиваючих реагентів, при якому фосфатний замісник приєднується через ароматичне кільце або через алкільну групу. Ці реагенти також несуть реакційноздатну ефірну групу і нітропіридилдитіогрупу, яка сприяє приєднанню через дисульфідні зв'язки.

На Фіг. 45-49 представлений синтез заряджених зшиваючих реагентів, які несуть, реакційноздатну ефірну групу і галоацетильний замісник, який сприяє приєднанню через тїоефірні зв'язки.

На Фіг. 50 представлений синтез попередника зарядженого лінкера, який генеруватиме метаболіт з негативно зарядженим карбоксилатом.

На Фіг. 51 представлений кон'югат лінкера 158 з лікарським препаратом і моноклональним антитілом і те, як цей кон'югат піддаватиметься обробці в лізосомах клітин мішені з утворенням метаболіту, який містить препарат, що несе негативно заряджений карбоксилат.

На Фіг. 52 представлений синтез попередника зарядженого лінкера, який генеруватиме метаболіт, який містить позитивно заряджений амін.

На Фіг. 53 представлений кон'югат зарядженого пролінкера з лікарським препаратом і моноклональним антитілом і те, як цей кон'югат піддаватиметься обробці в лізосомах клітин мішені з утворенням метаболіта, який містить препарат, що несе позитивно заряджений амін.

На Фіг. 54 представлений синтез попередника зарядженого лінкера, який генеруватиме метаболіт із зарядженим карбоксилатом.

На Фіг. 55 представлений кон'югат лінкера 172 з лікарським препаратом і моноклональним антитілом і те, як цей кон'югат піддаватиметься обробці в лізосомах клітин мішені з утворенням метаболіта, який містить препарат, що несе карбонову кислоту і залишок лізину.

На Фіг. 56 представлено застосування зарядженого лінкера при модифікації клітинозв'язувальної речовини і отриманні кон'югата препарат-клітинозв'язувальна речовина, який несе заряджений лінкер.

На Фіг. 57(A), (B) і (C) представлена активність *in vitro* кон'югатів препарат-клітинозв'язувальна речовина, в яких включений заряджений лінкер.

На Фіг. 58 представлена активність *in vitro* і вибірковість щодо мішені кон'югатів препарат-клітинозв'язувальна речовина, які несуть заряджений лінкер.

На Фіг. 59 представлений мас спектр кон'югатів препарат-клітинозв'язувальна речовина, які несуть заряджений лінкер.

5 На Фіг. 60 представлена цитотоксичність кон'югатів анти-CanAg (huC242) -сульфонатний лінкер-майтансиноїд при зростанні частки мایتансиноїдів (E:A) для клітин COLO205.

На Фіг. 61 представлена цитотоксичність кон'югатів анти-CanAg (huC242) -сульфонатний лінкер-майтансиноїд при зростанні частки мایتансиноїдів (E:A) для клітин COLO205-MDR з множинною лікарською стійкістю.

10 На Фіг. 62 представлено порівняння цитотоксичності кон'югатів анти-CanAg (huC242) -майтансиноїд з сульфогрупою в лінкері або без неї для клітин COLO205-MDR з множинною лікарською стійкістю.

На Фіг. 63 представлено порівняння цитотоксичності кон'югатів анти-EpCAM (B38.1) -майтансиноїд з сульфогрупою в лінкері або без неї для клітин COLO205-MDR з множинною лікарською стійкістю.

15 На Фіг. 64 представлено порівняння цитотоксичності кон'югатів анти-EpCAM (B38.1) -майтансиноїд з сульфогрупою в лінкері або без неї для клітин HCT15 з множинною лікарською стійкістю.

На Фіг. 65 представлено порівняння цитотоксичності кон'югатів анти-EpCAM (B38.1) -майтансиноїд з сульфогрупою в лінкері або без неї для клітин COLO205-MDR з множинною лікарською стійкістю.

На Фіг. 66 представлена протипухлинна активність *in vivo* кон'югатів антитіло проти EpCAM-майтансиноїд на ксенотрансплантати COLO205 *mdr* (індивідуальні пухлини).

25 На Фіг. 67 представлена протипухлинна активність *in vivo* кон'югатів антитіло проти EpCAM-майтансиноїд на ксенотрансплантати COLO205 (індивідуальні пухлини).

На Фіг. 68-70 представлені способи синтезу сульфованих зшиваючих реагентів. Ці реагенти містять реакційноздатну ефірну групу і малеїмідну групу, яка сприяє приєднанню через тіоефірні зв'язки.

На Фіг. 71 представлені способи синтезу зшиваючих реагентів, які містять четвертинний амін. Ці реагенти також несуть реакційноздатну ефірну групу і піридилдитіогрупу, яка сприяє приєднанню через дисульфідні зв'язки.

На Фіг. 72(A) і (B) представлена фармакокінетика в плазмі кон'югатів антитіло huC242-сульфо-Mal-[<sup>3</sup>H-мічений]DM4 при 3,5 DM4/Ab або 6,4 DM4/Ab в дозах 12,9 міліграм/кг і 7,9 міліграм/кг (*i.v.*), відповідно, у мишей CD-1. А. Концентрація Ab (при вимірюванні методом ELISA або методом <sup>3</sup>H-радіометрії) залежно від часу після введення. В. Співвідношення мایتансиноїд (DM4) /антитіло (Ab) залежно від часу після введення.

На Фіг. 1-71, де це може бути застосованим, n позначає 0 або ціле число від 1 до 10, а m позначає 0 або ціле число від 1 до 2000.

#### Здійснення винаходу

40 У нових кон'югатах, розкритих у даному винаході, застосовуються заряджені зшиваючі реагенти або їх попередники. Приклади деяких відповідних зшиваючих реагентів та їх синтезу представлені на Фіг. 1-10. Переважно заряджені зшиваючі реагенти або їх попередники містять такі замісники, як сульфогрупа, фосфатна група, карбоксил або четвертинна аміногрупа, які істотно підвищують розчинність модифікованої клітинозв'язувальної речовини і кон'югатів клітинозв'язувальної речовини з лікарськими препаратами, особливо у кон'югатів моноклональне антитіло-препарат при співвідношенні від 2 до 20 молекул препарату на антитіло. Кон'югати, приготовані з лінкерів, які містять попередник зарядженої групи, утворюють одне або декілька заряджених угруповань після того, як кон'югат піддається метаболізму в клітині.

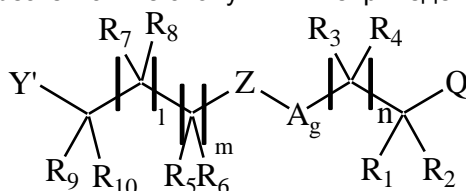
#### Зшиваючі реагенти

50 Шляхи синтезу для отримання заряджених зшиваючих реагентів даного винаходу представлені на Фіг. 1-49. Шляхи синтезу для отримання зшиваючих реагентів із зарядженими попередниками представлені на Фіг. 50, 52 і 54. На Фіг. 51, 53 і 55 представлені кон'югати кожного з відповідних попередників заряджених лінкерів з лікарським препаратом і моноклональним антитілом і те, як ці кон'югати піддаватимуться метаболізму в клітинах мішені з утворенням заряджених метаболітів. Зшиваючі реагенти мають три елементи: а) замісник, який або є зарядженим, або стане зарядженим при метаболізмі кон'югатів з цими лінкерами в клітинах. Заряд повинен бути або аніонним типу карбоксилату, сульфонату або фосфату, або катіонним типу третинного, четвертинного або первинного аміну або азотовмісного гетероциклу; б) групу типу складного ефіру N-гідроксисукциніміду, малеїмідної групи, галоацетильної групи



або гідразиду, здатну реагувати з клітинозв'язувальною речовиною; і с) групу типу дисульфідної, малеїмідної, галоацетильної або гідразиду, здатну реагувати з лікарським препаратом. Заряджений замісник або його попередник може бути введений описаними у даному винаході способами. Наприклад, заряд сульфонату можна ввести спочатку шляхом обробки комерційно доступного складного галоефіру тіоацетатом, отримуючи тіоацетильну сполуку, а потім окислення тіоацетильної групи за допомогою перекису водню до сульфонатної групи. Фосфатовані зшиваючі реагенти можна синтезувати описаними в даному винаході способами. Спочатку вводиться потрібна реакційноздатна група типу тіолу, малеїмїду, галоацетилю або гідразиду за допомогою реакцій, приведених на Фіг. 6-10, а потім проводиться гідроліз ефіру фосфату, отримуючи заряджений зшиваючий реагент, який несе фосфат. Позитивно заряджену заміщаючу групу четвертинного аміну можна ввести в зшиваючий реагент в результаті реакції аміну з  $\alpha,\beta$ -ненасиченим кетоном (наприклад, див. Фіг. 13 і 37). Як альтернатива заряджену заміщаючу аміногрупу можна ввести шляхом заміщення галогену аміном або азотовмісною гетероциклічною сполукою.

Переважаю зшиваючими реагентами є сполуки нижчеприведеної формули (I):



(I)

де: Y' позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість реакції з клітинозв'язувальною речовиною;

Q позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість приєднання цитотоксичного лікарського препарату через дисульфідний, тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, ефірний, складноефірний, карбаматний або амідний зв'язок;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю, аніони типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, катіони типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, або феніл, причому:

R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>13</sub> є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

A позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж зарядженого замісника, вибраного з поміж аніонів типу SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів типу азотовмісних гетероциклічних сполук N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, де X має ті ж значення, що і вище, а g = 0 або 1;

Z позначає необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, або ланку F1-E1-P-E2-F2, в якій E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O, O або NR<sub>14</sub>, де R<sub>14</sub> позначає H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 20 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, за умови, що якщо Z не F1-E1-P-E2-F2, то щонайменше один з R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником, а якщо g = 1, то щонайменше один з A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником.

Приклади функціональної групи Y', яка зумовлює можливість реакції з клітинозв'язувальною речовиною, включають реагенти, які реагують з амінами, типу складних ефірів N-гідроксисукциніміду, n-нітрофенілу, динітрофенілу, пентафторфенілу; реагенти, які реагують з тіолами типу піридилдисульфідів, нітропіридилдисульфідів, малеїмідів, галоацетатів і галоангідридів карбонових кислот.

Приклади функціональної групи Q, яка зумовлює можливість приєднання цитотоксичного лікарського препарату, включають групи, які сприяють приєднанню через дисульфідний,

тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, складноефірний або амідний зв'язок. До таких функціональних груп відносяться тіоли, дисульфіди, аміногрупи, карбоксигрупи, альдегідні, малеїмідні, галоацетили, гідразини і гідроксили.

Приклади лінійних алкілів включають метил, етил, пропіл, бутил, пентил і гексил. Приклади розгалужених або циклічних алкілів, які містять 3-6 атомів вуглецю, включають ізопропіл, втор-бутил, ізобутил, трет-бутил, пентил, гексил, циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил.

Приклади лінійних алкенілів, які містять 2-6 атомів вуглецю, включають етеніл, пропеніл, бутеніл, пентеніл, гексеніл. Приклади розгалужених або циклічних алкенілів, які містять 2-6 атомів вуглецю, включають ізобутеніл, ізопентеніл, 2-метил-1-пентеніл, 2-метил-2-пентеніл.

Приклади лінійних алкінілів, які містять 2-6 атомів вуглецю, включають етиніл, пропініл, бутиніл, пентиніл, гексиніл. Приклади розгалужених або циклічних алкінілів, які містять до 6 атомів вуглецю, включають 3-метил-1-бутиніл, 3-метил-1-пентиніл, 4-метил-2-гексиніл.

У кращих втіленнях один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є зарядженим замісником з поміж сульфонату, фосфату або триалкіламонію, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; Q і Y', незалежно один від одного, означають заміщаючу групу дисульфіду, малеїмїду, галоацетилу або складного ефіру N-гідроксисукциніміду. У кращому втіленні один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; Q позначає групу дисульфіду, малеїмїду або галоацетилу; а Y' позначає групу малеїмїду або складного ефіру N-гідроксисукциніміду. У ще кращому втіленні один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; Q позначає піридилдитіо- або нітропіридилдитіогрупу, групу малеїмїду або галоацетилу; а Y' – складного ефіру N-гідроксисукциніміду.

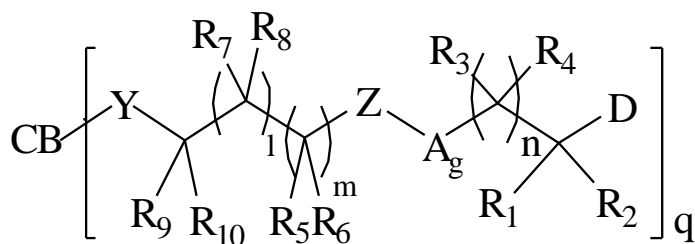
Синтез зшиваючих реагентів формули (I), які містять 2-дитіонітропіридил і 2-дитіодінітропіридил представлений, наприклад, на Фіг. 1 і 2, а синтез зшиваючих реагентів формули (I), які містять, відповідно, 4-дитіонітропіридил і 4-дитіодінітропіридил, представлений, наприклад, на Фіг. 6. Синтез заряджених зшиваючих реагентів формули (I) з сульфогрупою, які містять малеїмід, представлений, наприклад, на Фіг. 3, 4 і 5. Синтез заряджених зшиваючих реагентів формули (I) з фосфатною групою, які містять малеїмід, представлений, наприклад, на Фіг. 9 і 10. Синтез зшиваючих реагентів, які містять четвертинний амін формули (I) представлений, наприклад, на Фіг. 13 і 14. Синтез заряджених зшиваючих реагентів формули (I), які містять поліетиленгліколь, представлений, наприклад, на Фіг. 17-21. Синтез заряджених зшиваючих реагентів формули (I), що несуть групу гідразиду, яка сприяє приєднанню через кислотолабільні зв'язки, представлений, наприклад, на Фіг. 24-36.

Кон'югати клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами

За допомогою заряджених зшиваючих реагентів або попередників заряджених лінкерів можна вводити велике число (>6) молекул лікарського препарату. Як приклад на Фіг. 57 видно, що кон'югати клітинозв'язувальних речовин з препаратами, отримані за допомогою заряджених зшиваючих реагентів даного винаходу, проявляють високу активність. До того ж активність є вибірковою до мішені (наприклад, див. Фіг. 58), оскільки навіть після приєднання великого числа молекул препарату кон'югат проявляє високу активність у відношенні до клітин мішені, але набагато меншу активність у відношенні до клітин, які не відносяться до мішені. Як видно з Фіг. 59, мас-спектрометричний аналіз свідчить, що молекули препарату ковалентно з'єднуються з клітинозв'язувальною речовиною через заряджений лінкер.

Кон'югати запропоновані даним винаходом можна представити наступною формулою: CB-(L<sup>c</sup>-D)<sub>q</sub>, де CB позначає клітинозв'язувальну речовину, L<sup>c</sup> – заряджений лінкер або пролінкер, D – молекула препарату, а q – ціле число від 1 до 20.

Переважно кон'югати мають наступну формулу (II):



(II)

де: CB позначає клітинозв'язувальну речовину;

D позначає лікарський препарат, сполучений з клітинозв'язувальною речовиною дисульфідним, тіоефірним, складнотіоефірним, пептидним, гідразоновим, ефірним, складноефірним, карбаматним або амідним зв'язком;

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є однаковими або різними і означають Н, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкиніл, що містить 2-6 атомів вуглецю, аніони типу  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  катіони типу азотовмісних гетероциклічних сполук  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , або феніл, причому:

$R_{11}, R_{12}$  і  $R_{13}$  є однаковими або різними і означають Н, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а Х позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

А позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний з поміж аніонів типу  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  і катіонів типу азотовмісних гетероциклічних сполук  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , де Х має ті ж значення, що і вище, а g = 0 або 1;

Z позначає необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, або ланку F1-E1-P-E2-F2, в якій E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O, O або  $NR_{14}$ , де  $R_{14}$  позначає Н, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкиніл, що містить 2-6 атомів вуглецю; Р позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 20 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000, за умови, що якщо Z не F1-E1-P-E2-F2, то щонайменше один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, а якщо g = 1, то щонайменше один з поміж A,  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником;

Y позначає карбонільну, тіоефірну, амідну, дисульфідну або гідразонову групу; а q позначає ціле число від 1 до 20.

Як детальніше описано нижче, лікарський препарат може бути будь-яким з поміж багатьох препаратів типу невеликих молекул, включаючи майтансиноїди, аналоги CC-1065, морфоліни, доксорубіцини, таксани, криптофіцини, епотіони, каліхеаміцини, ауристатіни і димери піролобензодіазепінів.

У кращих втіленнях один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є зарядженим замісником з поміж сульфонату, фосфату, карбоксилату або триалкіламонію, а всі решта – Н; всі l, g і m = 0; n = 1; D позначає майтансиноїд, аналог CC-1065 або димер піролобензодіазепіну. У кращому втіленні один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – Н; всі l, g і m = 0; n = 1; D позначає майтансиноїд, аналог CC-1065 або димер піролобензодіазепіну, приєднаний через дисульфідний, тіоефірний або складнотіоефірний зв'язок. У ще кращому втіленні один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – Н; всі l, g і m = 0; n = 1; і D позначає майтансиноїд, аналог CC-1065 або таксан.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O або  $NR_{14}$ , де  $R_{14}$  позначає Н, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю; Р позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 8 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду, а кращими амінокислотними залишками є гліцин (gly), аланін (ala), лейцин (leu), глутамінова кислота (glu) або лізин (lys), які можуть використовуватися в будь-якій комбінації або у будь-якому порядку (напр., gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu тощо); а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O або  $NR_{14}$ , де  $R_{14}$  позначає Н або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю; Р позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 5 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 24.

Бажано q, число молекул препарату, приєднаних до кожної клітинозв'язувальної речовини, складає 1-20, краще 2-18, ще краще 2-16 і найкраще 2-10.

Для того, щоб синтезувати кон'югат, можна модифікувати клітинозв'язувальну речовину за

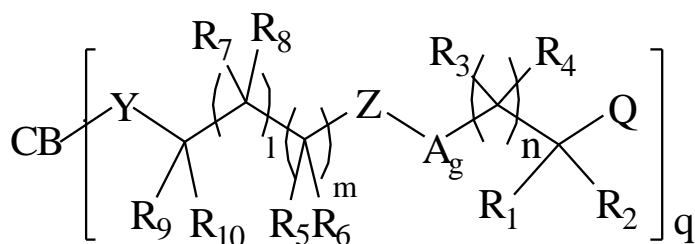
допомогою зшиваючих реагентів даного винаходу, вводячи реакційноздатні дисульфідні, малеїмідні, галоацетильні або гідразидні групи. Синтез кон'югатів клітинозв'язувальних речовин з препаратами, сполученими через дисульфідні зв'язки, здійснюється шляхом дисульфідного обміну між дисульфідним зв'язком в модифікованій клітинозв'язувальній речовині і препаратом, який містить вільну тіолову групу. Синтез кон'югатів клітинозв'язувальних речовин з препаратами, сполученими через тіоефірні зв'язки, здійснюється шляхом реакції модифікованої малеїмідом або галоацетилом клітинозв'язувальної речовини з препаратом, який містить вільну тіолову групу. Синтез кон'югатів, які несуть кислотолабільний гідразоновий зв'язок, може здійснюватися шляхом реакції карбонільної групи з гідразидною групою в лінкері за допомогою відомих методів (наприклад, див. Hamann P. et al., BioConjugate Chem., 13, 40-46, 2002; Laguzza B. et al., J. Med. Chem., 32, 548-555, 1959; Trail P. et al., Cancer Res., 57, 100-105, 1997).

З іншого боку, можна модифікувати лікарський препарат за допомогою зшиваючих реагентів даного винаходу, отримуючи модифікований препарат формули (IV), який несе функціональну групу, здатну реагувати з клітинозв'язувальною речовиною. Наприклад, препарат, який містить тіол можна піддати реакції із зарядженим зшиваючим реагентом або його попередником формули (I), які несуть заміщуючу групу малеїмиду, при нейтральному рН у водному буфері, отримуючи препарат, сполучений із зарядженим лінкером через тіоефірний зв'язок. Препарат, який містить тіол можна піддати дисульфідному обміну із зарядженим лінкером, який несе групу дитіопіридилилу, отримуючи модифікований препарат, приєднаний через дисульфідний зв'язок до зарядженого лінкера. Препарат, який несе гідроксильну групу, можна піддати реакції із зарядженим зшиваючим реагентом або його попередником, які містять галоген, у присутності слабкої основи, отримуючи модифікований препарат, який несе ефірний зв'язок. Препарат, який містить гідроксильну групу, можна піддати конденсації із зарядженим зшиваючим реагентом формули (I), який несе карбоксильну групу, у присутності дегідратуючого агента типу дициклогексилкарбодііміду, отримуючи складноефірний зв'язок. Аналогічним чином препарат, який містить аміногрупу, можна піддати конденсації з карбоксильною групою на зарядженому зшиваючому реагенті або його попереднику формули (I), отримуючи амідний зв'язок.

Кон'югат може бути очищений стандартними біохімічними способами, як то методами гель-фільтрації на колонці Sephadex G25 або Sephacryl S300, адсорбційної або іонообмінної хроматографії або діалізу, як описано раніше. В деяких випадках (напр., фолієвої кислоти, меланоцит-стимулюючого гормону, EGF тощо) кон'югати клітинозв'язувальних речовин з препаратами можна очистити таким методом хроматографії, як HPLC, колоночна хроматографія середнього тиску або іонообмінна хроматографія.

Модифіковані клітинозв'язувальні речовини

Клітинозв'язувальні речовини, модифіковані в результаті реакції із зшиваючими реагентами даного винаходу, переважно представлені формулою (III):



(III)

де замісники вже визначені вище як для зарядженого лінкера або пролінкера і кон'югата клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом.

У кращих втіленнях один з  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  є зарядженим замісником обраним з поміж сульфонату, фосфату, карбоксилу або триалкіламонію, а всі решта – H; всі  $l$ ,  $g$  і  $m = 0$ ;  $n = 1$ ; Q позначає заміщуючу групу дисульфиду, малеїмиду, галоацетилилу або складного ефіру N-гідроксисукциніміду, а Y позначає тіоефір, амід або дисульфід. У кращому втіленні один з поміж  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі  $l$ ,  $g$  і  $m = 0$ ;  $n = 1$ ; Q позначає угруповання дисульфиду, малеїмиду або галоацетилилу; а Y позначає тіоефір, амід або дисульфід. У ще кращому втіленні один з поміж  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі  $l$ ,  $g$  і  $m = 0$ ;  $n = 1$ ; Q позначає піридилдитіо- або нітропіридилдитіогрупу; а Y позначає тіоефір, амід або дисульфід.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O або NR<sub>14</sub>, де R<sub>14</sub> позначає H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 8 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через

кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду, а кращими амінокислотними залишками є гліцин (gly), аланін (ala), лейцин (leu), глутамінова кислота (glu) або лізин (lys), які можуть використовуватися в будь-якій комбінації або у будь-якому порядку (напр., gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu і так далі); а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p$ , де  $p = 0$  або цілому числу від 2 до 1000.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають  $\text{C}=\text{O}$  або  $\text{NR}_{14}$ , де  $\text{R}_{14}$  позначає H або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 5 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p$ , де  $p = 0$  або цілому числу від 2 до 24.

Модифіковану клітинозв'язувальну речовину можна отримати в результаті реакції клітинозв'язувальної речовини із зарядженими зшиваючими реагентами за допомогою методів, відомих для інших зшиваючих реагентів (U.S. Patent Nos. 6,340,701 B1, 5,846,545, 5,585,499, 5,475,092, 5,414,064, 5,208,020 і 4,563,304; Chari R.V.J. et al., Cancer Research 52, 127-131, 1992; Chari R.V.J. et al., Cancer Research 55, 4079-4084, 1995; Carlsson J. et al., 173 Biochem. J. (1978) 723-737(1978); Goff D.A. and Carroll S.F., 1 BioConjugate Chem. 381-386 (1990); Delprino L. et al., 82 J. Pharm. Sci. 506-512 (1993); Arpicco S. et al., 8 BioConjugate Chem. 327-337 (1997)). Бажано, оскільки групи зшиваючого реагенту розчинні у воді або вимагають лише невеликого відсотка органічного розчинника для підтримання розчинності у водних розчинах, реакція між клітинозв'язувальною речовиною і зшиваючим реагентом може проводитися у водному розчині. Зшиваючий реагент розчиняють у водному буфері, який необов'язково містить невелику кількість (зазвичай <10% за об'ємом) полярного органічного розчинника, який змішується з водою, наприклад, різних спиртів типу метанолу, етанолу і пропанолу, диметилформаміду, диметилацетаміду або диметилсульфоксиду у високій концентрації, наприклад, 1-100 mM, а потім в забуферений водний розчин додають відповідну порцію клітинозв'язувальної речовини. Відповідна порція – це така кількість розчину, яка вводить 1-10 зшиваючих груп на одну клітинозв'язувальну речовину, краще 1-5 груп, а розчин, що додається, не повинен перевищувати 10%, краще 5% або ще краще 0-3% об'єму розчину клітинозв'язувальної речовини. Водні розчини для клітинозв'язувальних речовин забуферюють при pH від 6 до 9, бажано при pH від 6,5 до 7,5, і вони можуть містити будь-які нуклеофільні буферні солі, придатні для цього інтервалу pH. Типові буфери включають фосфат, триетаноламін-HCl, HEPES і MOPS, які можуть містити додаткові компоненти, зокрема сахарозу і солі, наприклад, NaCl. Після додавання проводиться інкубація за температури від 4 °C до 40 °C, краще за кімнатної температури. Протікання реакції можна відстежувати за збільшенням поглинання при 495 нм або іншої відповідній довжині хвилі. Після закінчення реакції можна проводити виділення модифікованої клітинозв'язувальної речовини стандартним способом, наприклад, методом гел-фільтрації або адсорбційної хроматографії.

Ступінь модифікації можна оцінювати за поглинанням групи нітропіридиніону, що вивільняється, динітропіридиніону, карбоксамідопіридиніону або дикарбоксамідопіридиніону. Як приклад, на Фіг. 56 представлені результати модифікації клітинозв'язувальної речовини – антитіла C242 за допомогою сульфонатного зшиваючого реагенту даного винаходу. Представлений динаміка у часі включення лінкера/антитіла (L/A), наприклад, разом з приєднанням препарату/антитіла (D/A). Описані в даному винаході заряджені зшиваючі реагенти або пролінкери містять різні функціональні групи, які можуть реагувати з будь-якою клітинозв'язувальною речовиною, яка має відповідний замісник. Наприклад, клітинозв'язувальні речовини, які несуть заміщаючу аміногрупу або гідроксил, можуть реагувати із зшиваючими реагентами, які несуть складний ефір N-гідроксисукциніміду, а клітинозв'язувальні речовини, які несуть тіоловий замісник, можуть реагувати із зшиваючими реагентами, які несуть малеїмідну групу або галоацетил. Крім того, клітинозв'язувальні речовини, які несуть карбонільний замісник, можуть реагувати із зшиваючими реагентами, які несуть гідразид. Фахівець в цій галузі зможе легко визначити, який зшиваючий реагент потрібно використовувати, виходячи з відомої реакційної здатності наявної функціональної групи на клітинозв'язувальній речовині.

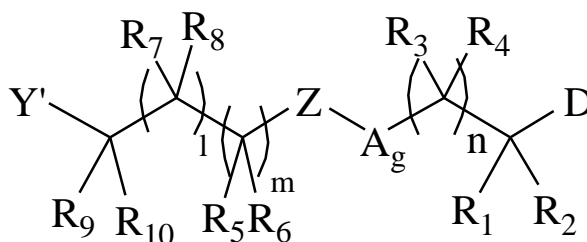
Зшиваючі реагенти, які несуть позитивний заряд (наприклад, сполуки 214 на Фіг. 71), можуть безпосередньо прореагувати з клітинозв'язувальною речовиною у водному буфері при pH від 5 до 9, який необов'язково містить органічний розчинник (зокрема 1-20% диметилацетаміду або етанолу), отримуючи модифіковану клітинозв'язувальну речовину, яка несе позитивний заряд і тіолову групу. Тіолова група клітинозв'язувальної речовини може реагувати з цитотоксичним

лікарським препаратом, який несе малеїмідну, галоацетамідну або активну дисульфідну (наприклад, піридилдитіо-, нітропіридилдитіо-) групу, утворюючи кон'югат. Кон'югат може бути очищений описаними вище способами.

З іншого боку, зшиваючі реагенти, які несуть позитивний заряд і реакційноздатну ефірну групу (наприклад, сполуки 216 на Фіг. 71), можуть безпосередньо прореагувати з клітинозв'язувальною речовиною (наприклад, через аміногрупу лізину) і ввести позитивний заряд і активний дисульфід. Реакція з тіолвмісним цитотоксичним лікарським препаратом, описана вище, може давати кон'югат, який несе позитивний заряд.

Модифіковані цитотоксичні лікарські препарати

Цитотоксичні препарати, модифіковані в результаті реакції із зшиваючими реагентами даного винаходу, бажано представлені формулою (IV):



(IV)

де замісники вже визначені вище як для зарядженого лінкера або пролінкера і кон'югата клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом.

У кращих втіленнях один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є зарядженим замісником обраним з поміж сульфонату, фосфату, карбоксилу або триалкіламонію, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; а Y' позначає заміщаючу групу дисульфиду, малеїмиду, галоацетилю або складного ефіру N-гідроксисукциніміду. У кращому втіленні один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; а Y' позначає угруповання малеїмиду або складного ефіру N-гідроксисукциніміду. У ще кращому втіленні один з поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$  є сульфонатом, а всі решта – H; всі l, g і m = 0; n = 1; а Y' позначає складний ефір N-гідроксисукциніміду.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O або  $NR_{14}$ , де  $R_{14}$  позначає H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 8 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду, а кращими амінокислотними залишками є гліцин (gly), аланін (ala), лейцин (leu), глутамінова кислота (glu) або лізин (lys), які можуть використовуватися в будь-якій комбінації або у будь-якому порядку (напр., gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu і так далі); а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 1000.

У кращому втіленні, якщо Z є ланкою F1-E1-P-E2-F2, то E1 і E2 є однаковими або різними і означають C=O або  $NR_{14}$ , де  $R_{14}$  позначає H або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю; P позначає пептидну ланку завдовжки від 2 до 5 амінокислот, причому E1 або E2 може з'єднуватися з пептидом через кінцевий азот, кінцевий вуглець або через бічний ланцюг однієї з амінокислот пептиду; а F1 і F2 є однаковими або різними і означають необов'язкову поліоксиетиленову ланку формули  $(OCH_2CH_2)_p$ , де p = 0 або цілому числу від 2 до 24.

Модифіковані лікарські препарати можна отримати в результаті реакції препарату із зшиваючими реагентами даного винаходу, отримуючи модифікований препарат формули (IV), який несе функціональну групу, здатну реагувати з клітинозв'язувальною речовиною. Наприклад, препарат, який містить тіол може прореагувати із зарядженим зшиваючим реагентом або пролінкером формули (I), який несе заміщаючу групу малеїмиду, при нейтральному pH у водному розчині, з отриманням препарату, сполученого із зарядженим лінкером або пролінкером через тіоефірний зв'язок. Препарат, який містить тіол можна піддати дисульфідному обміну із зарядженим лінкером або пролінкером, який несе групу дітіопіридилу, отримуючи модифікований препарат, сполучений через дисульфідний зв'язок із зарядженим лінкером або пролінкером. Препарат, який несе гідроксильну групу, може прореагувати із зарядженим зшиваючим реагентом, який містить галоген, у присутності слабкої основи, з отриманням модифікованого препарату, який несе ефірний зв'язок. Препарат, який містить гідроксильну групу можна піддати конденсації із зарядженим зшиваючим реагентом формули (I), який несе карбоксильну групу, у присутності дегідратуючого реагенту типу дициклогексилкарбодііміду, отримуючи складноефірний зв'язок. Аналогічним чином препарат,

який містить аміногрупу, можна піддати конденсації з карбоксильною групою на зарядженому зшиваючому реагенті або пролінкері формули (I), отримуючи амідний зв'язок. Модифікований препарат можна очистити стандартними методами типу колоночної хроматографії через силікагель або оксид алюмінію, кристалізації, препаративної тонкошарової хроматографії, іонообмінної хроматографії або HPLC.

#### Клітинозв'язувальні речовини

Клітинозв'язувальні речовини, які охоплюють, кон'югати і модифіковані клітинозв'язувальні речовини даного винаходу, можуть бути будь-якого типу, відомого зараз або в майбутньому, і включають пептиди і не пептиди. Клітинозв'язувальною речовиною може бути будь-яка сполука, яка може зв'язуватися з клітинами як специфічно, так і не специфічно. Зазвичай вони є антитілами (особливо моноклональними антитілами і фрагментами антитіл), аднектинами (US Publication No. 2007/0082365), інтерферонами, лімфокінами, гормонами, факторами росту, вітамінами, молекулами переносників поживних речовин (типу трансферину) або будь-якими іншими клітинозв'язувальними молекулами або речовинами.

Якщо клітинозв'язувальна речовина є антитілом (наприклад, антитілом миші, людини, гуманізованим, перебудованим або химерним або будь-яким іншим антитілом, відомим фахівцям), то вона зв'язується з антигеном, який є поліпептидом і може бути трансмембранною молекулою (напр., рецептором) або лігандом типу фактора росту. Приклади антигенів включають такі молекули, як ренін; гормон росту, включаючи гормон росту людини і гормон росту бика; рилізінг-фактор гормону росту; паратиреоїдний гормон; тиреоїд-стимулюючий гормон (тиреотропін); ліпопротеїди;  $\alpha$ 1-антитрипсин; А-ланцюг інсуліну; В-ланцюг інсуліну; проінсулін; фолікулостимулюючий гормон (фолітропін); кальцитонін; лютеїнізуючий гормон; глюкагон; коагулюючі фактори, зокрема фактор  $v_{tmc}$ , фактор IX, тканинний фактор (TF) і фактор фон Віллебранда; антикоагулюючі фактори типу білка С; атріальний натрійуретичний фактор; легеневий сурфактант; активатори плазміногену, зокрема урокіназу або сечовий або тканинний активатор плазміногену (t-PA); бомбезин; тромбін; гемопоетичний фактор росту; фактор некрозу пухлин альфа і бета; енкефаліназу RANTES (регульовану при активації, в нормі експресується в Т-клітинах і секретується); білок запалення макрофагів людини (MIP-1-альфа); сироватковий альбумін типу сироваткового альбуміну людини; мюлерівська інгібуюча субстанція; А-ланцюг релаксину; В-ланцюг релаксину; прорелаксин; гонадотропін-асоційований пептид миші; мікробний білок типу  $\beta$ -лактамази; ДНКазі; IgE; зв'язаний з цитотоксичними Т-лімфоцитами антиген (CTLA) типу CTLA-4; інгібін; активін; фактор росту судинного ендотелію (VEGF); рецептори для гормонів або факторів росту; білок А або D; ревматоїдні фактори; нейротрофічні фактори, зокрема кістковий нейротрофічний фактор (BDNF), нейротрофін-3 -4, -5 або -6 (NT-3, NT-4, NT-5 або NT-6), фактор росту нервів типу NGF- $\beta$ ; тромбоцитарний фактор росту (PDGF); фактор росту фібробластів типу aFGF і bFGF; фактор росту епідермісу (EGF); трансформуючий фактор росту (TGF) типу TGF-альфа і TGF-бета, включаючи TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 або TGF- $\beta$ 5; інсуліноподібний фактор росту-I і -II (IGF-I і IGF-II); des(1-3) -IGF-I (мозковий IGF-I); білки, які зв'язують інсуліноподібний фактор росту, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, рецептори EphA, рецептори EphB, рецептори фолату, мезотелін, кріпто, альфа, бета6-інтегрини, VEGF, VEGFR, рецептори трансферину, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; білки CD, зокрема CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 або антитіла, які зв'язуються з одним або декількома пухлинними антигенами або поверхневими клітинними рецепторами, приведені в US Publication No. 20080171040 або US Publication No. 20080305044, які включено у повному об'ємі, як посилання; еритропоетин; остеоіндуктивні фактори; імунотоксини; морфогенетичний білок кісток (BMP); інтерферони, зокрема альфа-, бета- і гамма-інтерферон; колонієстимулюючі фактори (CSFs), напр., M-CSF, GM-CSF і G-CSF; інтерлейкіни (ILs), напр., від IL-1 до IL-10; супероксиддисмутаза; Т-клітинні рецептори; поверхневі мембранні білки; прискорюючий розкладання фактор; вірусні антигени, такі, наприклад, як частина оболонки HIV; білки-переносники; навідні рецептори; агресини; регуляторні білки; інтегрини, такі як CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4, EPCAM і VCAM; пухлинні антигени типу рецепторів HER2, HER3 або HER4; і фрагменти будь-яких з вище перелічених поліпептидів.

Кращими антигенами для антитіл, охоплених даним винаходом, є білки CD, такі як CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 і CD46; представники родини рецепторів ErbB, зокрема рецептор EGF, рецептор HER2, HER3 або HER4; молекули клітинної адгезії, зокрема LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EPCAM, альфа<sub>4</sub>/бета<sub>7</sub>-інтегрин і альфа<sub>3</sub>/бета<sub>3</sub>-інтегрин, включаючи також їх альфа- або бета-субодиниці (напр., антитіла проти CD11a, проти CD18 або

проти CD11b); фактори росту типу VEGF; тканинний фактор (TF); TGF- $\beta$ ; альфа-інтерферон ( $\alpha$ -IFN); інтерлейкін типу IL-8; IGE; антигени груп крові; рецептор загибелі клітин Apo2; рецептор flk2/flt3; рецептор ожиріння (OB); рецептор mprl; CTLA-4; білок C та ін. Кращими антитілами, які можна використовувати, є антитіла до CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, рецепторів EphA (напр., рецептору EphA2), рецепторів EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, трастузумаб, пертузумаб, до мезотеліну, крипто, альфа<sub>v</sub>/бета<sub>6</sub>-інтегринів, VEGF, VEGFR, рецепторів фолату (напр., FOLR1), рецепторів трансферину, GD3, EpCAM або антитіла, які зв'язуються з одним або декількома пухлинними антигенами або поверхневими клітинними рецепторами, приведені в US Publication No. 20080171040 або US Publication No. 20080305044, які включено у повному обсязі як посилання.

Додаткові приклади клітинозв'язувальних речовин, які можуть бути використані, включають: – перебудовані антитіла (U.S. Patent No. 5,639,641);

– гуманізовані або повністю людські антитіла обрані з поміж huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, трастузумаб, пертузумаб, біватузумаб, сибротузумаб, і ритуксимаб (напр., див. U.S. Patent Nos. 5,639,641, 5,665,357, 7,342,110; U.S. Provisional Patent Application No. 60/424,332; International Patent Application WO 02/16,401; U.S. Patent Publication No. 20060045877; U.S. Patent Publication No. 20060127407; U.S. Patent Publication No. 20050118183; Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235, 959-973 (1994); Roguska et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91: 969-973 (1994); Colomer et al., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001); Heider et al., Eur. J. Cancer, 31A: 2385-2391 (1995); Welt et al., J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994); and Maloney et al., Blood, 90: 2188-2195 (1997)); і

– епітопозв'язуючі фрагменти антитіл типу sFv, Fab, Fab' і F(ab')<sub>2</sub> (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al, J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960)).

Додаткові клітинозв'язувальні речовини включають інші клітинозв'язувальні білки і поліпептиди, зокрема:

– білки-повтори анкірину (DARPin; Zahnd et al., J. Biol. Chem., 281, 46, 35167-35175 (2006); Binz H.K., Amstutz P. & Pluckthun A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268); або анкіриноподібні білки-повтори або синтетичні пептиди, описані, наприклад, в U.S. Patent Publication Number 20070238667; U.S. Patent No. 7,101,675; WO 2007/147213; WO 2007/062466);

– інтерферони (напр.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ );

– лімфокіни типу IL-2, IL-3, IL-4, IL-6);

– гормони, такі як інсулін, TRH (тіротропін-вивільняючий гормон, або тіроліберин), MSH (меланоцитостимулюючий гормон, або меланотропін), стероїдні гормони, зокрема андрогени і естроген;

– вітаміни, такі як фолієва кислота;

– фактори росту і колонієстимулюючі фактори типу EGF, TGF- $\alpha$ , G-CSF, M-CSF і GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)); і

– трансферин (O'Keefe et al., J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985)).

Методи моноклональних антитіл дозволяють отримувати специфічні клітинозв'язувальні речовини у вигляді моноклональних антитіл. Особливо добре відомі методи створення моноклональних антитіл, які отримують при імунізації мишей, щурів, хом'яків або інших ссавців заданим антигеном типу інтактних клітин мішені, антигенів, виділених з клітин мішені, цілих вірусів, ослаблених цілих вірусів і таких вірусних білків, як білки вірусної оболонки. Також можна використовувати сенсibilізовані клітини людини. Інший метод створення моноклональних антитіл полягає у використанні фагових бібліотек sFv (одноланцюгової варіабельної області), зокрема sFv людини (напр., див. Griffiths et al., U.S. Patent No. 5,885,793; McCafferty et al., WO 92/01047; і Liming et al., WO 99/06587).

Вибір відповідної клітинозв'язувальної речовини залежить від конкретної популяції клітин, на яку потрібно впливати, але в цілому кращими є моноклональні антитіла та їх епітопозв'язувальні фрагменти, якщо знайдуться придатні.

Наприклад, моноклональним антитілом My9 є антитіло миші типу IgG<sub>2a</sub>, яке є специфічним щодо антигену CD33 на клітинах гострої мієлоїдної лейкемії (AML) (Roy et al., Blood 77:2404-2412 (1991)) і може застосовуватися для лікування хворих на AML. Так само моноклональне антитіло анти-B4 є IgG<sub>1</sub> миші, який зв'язується з антигеном CD19 на B-клітинах (Nadler et al., J. Immunol. 131:244-250 (1983)) і може застосовуватися, якщо мішенню є B-клітини або уражені хворобою клітини, які експресують цей антиген, зокрема при лімфомі не-Ходжкіна або хронічній лімфобластичній лейкемії. Так само і антитіло N901 є моноклональним антитілом миші типу IgG<sub>1</sub>, яке зв'язується з CD56 на клітинах дрібноклітинної карциноми легенів і на клітинах інших



пухлин нейроендокринного походження (Roy et al., J. Nat. Cancer Inst. 88:1136-1145 (1996)), а антитіло C242 зв'язується з антигеном CanAg, пертузумаб і трастузумаб зв'язуються з HER2/неу, і антитіла проти рецептора EGF.

Крім того, GM-CSF, який зв'язується з мієлоїдними клітинами, може застосовуватися як клітинозв'язувальний агент на уражених клітинах при гострій мієлогенній лейкемії. IL-2, який зв'язується з активованими Т-клітинами, може застосовуватися для запобігання відторгненню трансплантата, для лікування і профілактики реакції «трансплантат проти господаря» і для лікування гострої Т-клітинної лейкемії. MSH, який зв'язується з меланоцитами, може застосовуватися для лікування меланоми. Фолієва кислота, яка діє на рецептор фолату, який експресується при раку яєчників та інших пухлинах, також є придатним клітинозв'язувальним агентом.

На рак молочної залози і рак яєчка як клітинозв'язувальними агентами можна успішно впливати естрогеном (або аналогами естрогену) або андрогеном (або аналогами андрогену), відповідно.

Лікарські препарати

Лікарські препарати, які можна використовувати в даному винаході, включають хіміотерапевтичні засоби (засоби хіміотерапії). «Засобом хіміотерапії» є хімічна сполука, яку застосовують при лікуванні раку. Приклади засобів хіміотерапії включають алкілюючі реагенти, такі як тіотепа і циклофосфамід (CYTOXAN™); алкілсульфонати, зокрема бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азіридини, зокрема бензодопа, карбоквоне, метуредопа і уредопа; етиленіміни і метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); кампотечіни (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелесин, карзелесин і бізелесин); криптофіцини (зокрема кріптофіцин-1 і кріптофіцин-8); доластатин; дуокарміцин (включаючи його синтетичні аналоги KW-2189 і CBI-TMI); елеутеробін; панкратистатин; саркодіктин; спонгістатин; похідні гірчичного газу (іприту), зокрема хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид мехлоретаміну оксид, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий іприт; нітрозосечовина, зокрема кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустин; антибіотики, такі як ендійнові антибіотики (напр., каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гама-1 і каліхеаміцин фета-1, напр., див. Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динеміцин, зокрема динеміцин А; еспераміцин; а також хромофор неокарциностаніну і хромофори споріднених хромопротейдів – ендійнових антибіотиків), акласиноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін; хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, нітоміцини, мікофенолова кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидін, убенімекс, зиностатин, еорубіцин; антиметаболіти, зокрема метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, зокрема деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексетат; аналоги пуринів, зокрема флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміпурин, тіогуанін; аналоги піримідинів, зокрема анцитабін, азацитідин, 6-азаурідин, кармофур, цитарабін, дидезоксиурідин, доксифлурідин, еноцитабін, флоксурідин, 5-FU; андрогени, зокрема калюстерон, дромостанолону пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; антиадреналічні, зокрема аміноглутетимід, мітотан, трилостан; компенсатор фолієвої кислоти, зокрема фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід-глікозид; амінолевулінова кислота; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефофамін; демекольцин; діазиквон; ельфомітин; еліптинію ацетат; епотилон; етоглуцид; галію нітрат; гідроксисечовина; лентинан; лонідамін; майтансиноїди, зокрема майтансин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонова кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецини (особливо токсин Т-2, веракурін А, рорідин А і ангвідин); уретан; віндесин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид («ARA-C»); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, напр., паклітаксель (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) і доксетаксель (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франція); хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин С; мітоксантрон; вінкристин; вінорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин;

аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT-11; інгібітор топоізомераз RFS 2000; диформетилломітин (DMFO); ретиноєва кислота; капецитабін; та їх фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні. Це визначення також охоплює антигормональні засоби, які регулюють або інгібують дію гормонів на пухлини, зокрема антиестроген, зокрема тамоксифен, ралоксифен, інгібуючі ароматази 4(5)-імідазоли, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен (Fareston); і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гoserелін; siRNA та їх фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні. Інші засоби хіміотерапії, які можна використовувати в даному винаході, приведені в US Publication No. 20080171040 і US Publication No. 20080305044, які включені у повному обсязі як посилання.

У кращому втіленні препарати хіміотерапій в основному є невеликими молекулами. «Препарат типу невеликої молекули» в даному винаході застосовується в широкому сенсі для позначення органічних, неорганічних або металоорганічних сполук, молекулярна вага яких може складати, наприклад, від 100 до 1500, краще від 120 до 1200, особливо від 200 до 1000, а зазвичай складає менше 1000. Препарати типу невеликих молекул відповідно до винаходу охоплюють олігопептиди та інші біомолекули з молекулярною вагою меншою від 1000. Препарати типу невеликих молекул добре охарактеризовані, серед іншого, в WO 05058367A2, European Patent Application Nos. 85901495 і 8590319, і в U.S. Patent No. 4,956,303, які включені у повному обсязі як посилання.

Кращими препаратами типу невеликих молекул є ті, які підходять для зв'язування з клітинозв'язувальними речовинами. Винахід включає як відомі препарати, так і ті, що можуть стати відомими. Найкращими препаратами типу невеликих молекул є цитотоксичні засоби.

Цитотоксичні засоби можуть бути будь-якими сполуками, які викликають загибель клітин або клітинну смерть або якимсь чином зменшують життєздатність клітин, причому кожен цитотоксичний засіб містить тіолову групу.

Кращими цитотоксичними засобами є майтансиноїди, таксани, сполуки CC-1065, даунорубіцину і доксорубіцину, димери піролобензодіазепіну, каліхеаміцини, ауристатини та їх аналоги і похідні, з яких деякі описані нижче.

Інші цитотоксичні засоби, які не обов'язково є невеликими молекулами, такі як невелика інтерферуюча РНК (ніРНК, siRNA), також охоплені даним винаходом. Наприклад, можна сполучати ніРНК із зшиваючими реагентами даного винаходу за допомогою методів, які зазвичай вживаються для модифікування олігонуклеотидів (напр., див. US Patent Publications 20050107325 і 20070213292). Так, ніРНК у вигляді 3'- або 5'-фосфорамідита піддають реакції з одним кінцем зшиваючого реагенту, який несе функціональну групу гідроксилу, отримуючи складноєфірний зв'язок між ніРНК і зшиваючим реагентом. Аналогічним чином реакція фосфорамідиту ніРНК із зшиваючим реагентом, який несе кінцеву аміногрупу, призводить до приєднання зшиваючого реагенту до ніРНК через амін. ніРНК описані детально в U.S. Patent Publication Numbers: 20070275465, 20070213292, 20070185050, 20070161595, 20070054279, 20060287260, 20060035254, 20060008822, 20050288244, 20050176667, які включені в даний винахід у повному обсязі як посилання.

#### Майтансиноїди

Майтансиноїди, які можна використовувати в даному винаході, добре відомі і можуть бути виділені з природних джерел відповідно до відомих методів або отримані шляхом синтезу відповідно до відомих методів.

Приклади відповідних майтансиноїдів включають майтансинол і аналоги майтансинолу. Приклади відповідних аналогів майтансинолу включають аналоги, які містять модифіковане ароматичне кільце, і аналоги, які містять модифікації у інших положеннях.

Конкретні приклади відповідних аналогів майтансинолу з модифікованим ароматичним кільцем включають:

(1) С-19-дехлоро (U.S. Patent No. 4,256,746) (отримують шляхом відновлення ансамітоцину Р2 за допомогою LАH);

(2) С-20-гідрокси (або С-20-деметил) +/- С-19-дехлоро (U.S. Patent Nos. 4,361,650 і 4,307,016) (отримують шляхом деметилування за допомогою Streptomyces або Actinomyces або дехлорування за допомогою LАH); і

(3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR) +/- дехлоро (U.S. Patent No. 4,294,757) (отримують шляхом ацилювання за допомогою хлорангідридів).

Конкретні приклади відповідних аналогів майтансинолу з модифікаціями у інших положеннях включають:

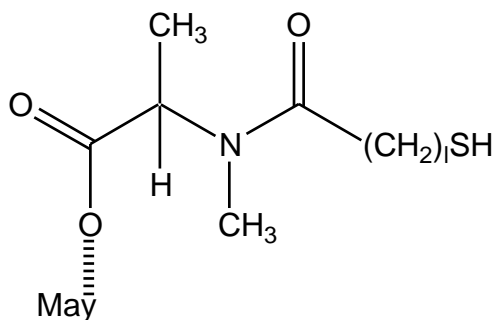
(1) С-9-SH (U.S. Patent No. 4,424,219) (отримують в результаті реакції майтансинолу з H<sub>2</sub>S або Р<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);

- (2) C-14-алкоксиметил (деметокси/CH<sub>2</sub>OR) (U.S. Patent No. 4,331,598);  
 (3) C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH або CH<sub>2</sub>OAc) (U.S. Patent No. 4,450,254) (отримують з *Nocardia*);  
 (4) C-15-гідрокси/ацилокси (U.S. Patent No. 4,364,866) (отримують шляхом перетворення  
 5 майтансинолу за допомогою *Streptomyces*);  
 (5) C-15-метокси (U.S. Patent Nos. 4,313,946 і 4,315,929) (виділяють з *Trewia nudiflora*);  
 (6) C-18-N-деметил (U.S. Patent Nos. 4,362,663 і 4,322,348) (отримують шляхом  
 деметилування майтансинолу за допомогою *Streptomyces*); і  
 (7) 4,5-дезоксид (U.S. Patent No. 4,371,533) (отримують шляхом відновлення майтансинолу за  
 10 допомогою трихлориду титану/LAH).

Синтез майтансиноїдів, які містять тіол і які можуть бути застосованими в даному винаході, повністю розкритий в U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064, і в U. S. Patent Application No. 20040235840.

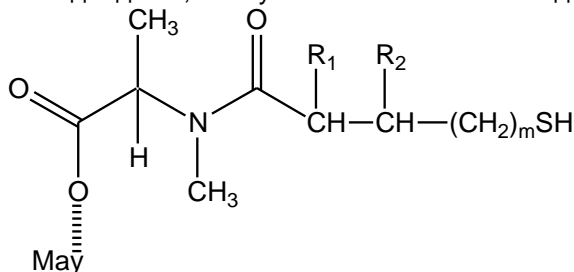
Майтансиноїди з тіоловою групою в положенні C-3, положенні C-14, положенні C-15 або  
 15 положенні C-20, як очікується, всі можуть бути застосованими. Кращим є положення C-3, найкраще положення C-3 у майтансинолу. Також бажаними є майтансиноїди, які містять N-метилаланін з тіоловою групою на C-3, майтансиноїди, які містять N-метилцистеїн з тіоловою групою на C-3, та їх аналоги.

Конкретні приклади похідних майтансиноїдів, які містять N-метилаланін з тіоловою групою  
 20 на C-3, які можуть бути застосованими в даному винаході, представлені формулами M1, M2, M3, M6 і M7.



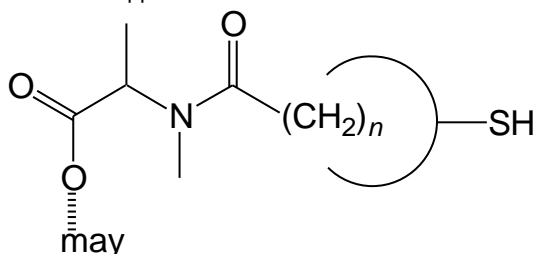
M1

де: I позначає ціле число від 1 до 10, а May позначає майтансиноїд.



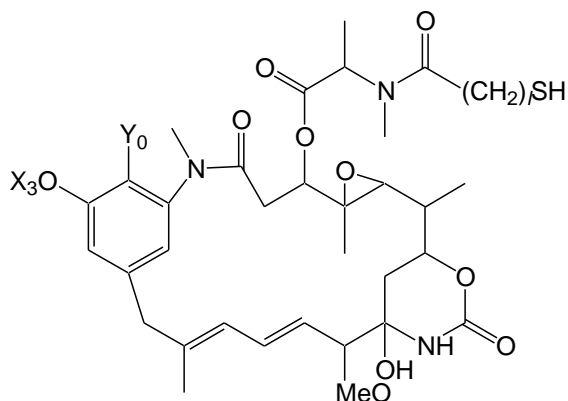
M2

де: R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> означають H, CH<sub>3</sub> або CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, які можуть бути однаковими або різними; m = 0, 1, 2 або 3; а May позначає майтансиноїд.

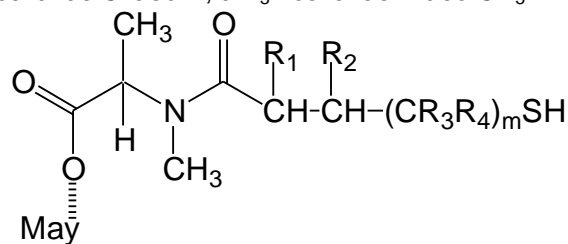


M3

де: n позначає ціле число від 3 до 8; а May позначає майтансиноїд.



M6

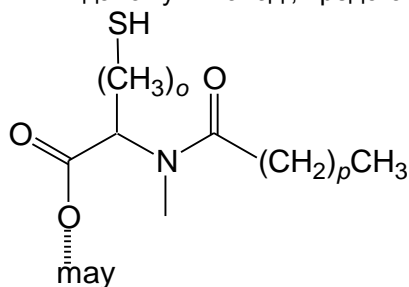
де:  $l = 1, 2$  або  $3$ ;  $Y_0$  позначає Cl або H; а  $X_3$  позначає H або  $CH_3$ .

5

M7

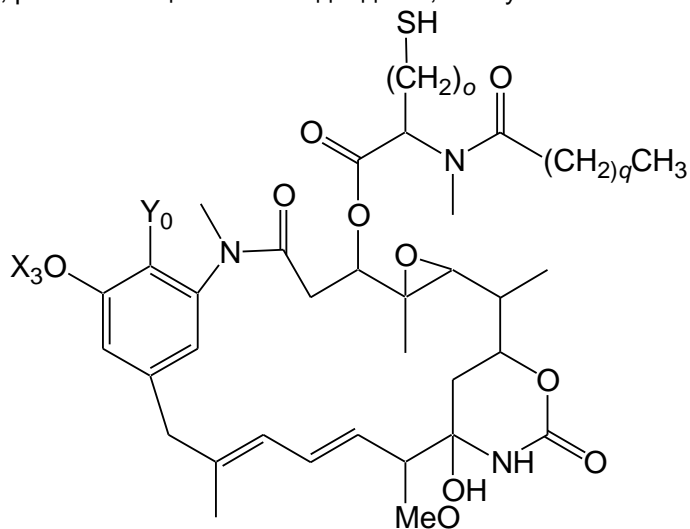
де:  $R_1, R_2, R_3, R_4$  означають H,  $CH_3$  або  $CH_2CH_3$ , які можуть бути однаковими або різними;  $m = 0, 1, 2$  або  $3$ ; а May позначає майтансиноїд.

Конкретні приклади похідних майтансиноїдів, які містять N-метилцистеїн з тіловою групою на C-3 і можуть бути застосованими в даному винаході, представлені формулами M4 і M5.



10

M4

де:  $o = 1, 2$  або  $3$ ;  $p$  позначає ціле число від 0 до 10; а May – майтансиноїд.

M5

15

де:  $o = 1, 2$  або  $3$ ;  $q$  позначає ціле число від 0 до 10;  $Y_0$  позначає Cl або H; а  $X_3$  позначає H або  $CH_3$ .

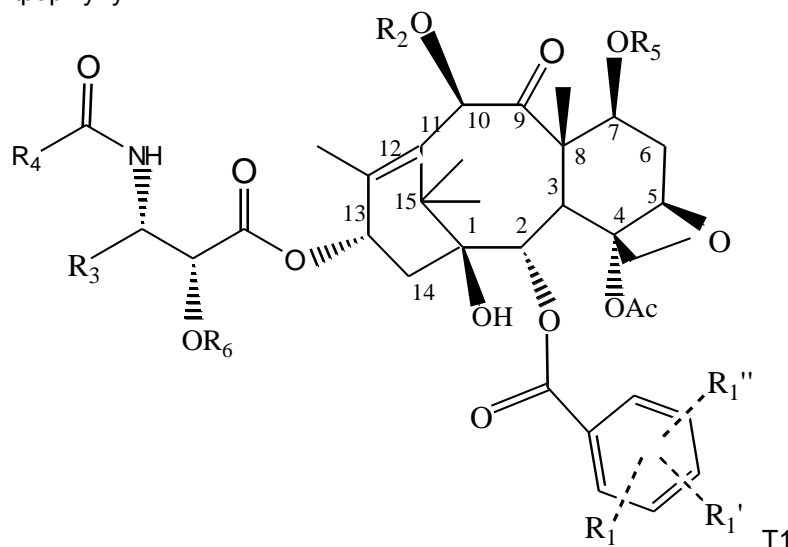
Кращими майтансиноїдами є ті, що описані в U.S. Patent Nos. 5,208,020; 5,416,064;

6,333,410; 6,441,163; 6,716,821; RE39,151 і 7,276,497.

Таксани

Цитотоксичні засоби відповідно до даного винаходу можуть бути і таксанами.

- Таксани, які можна використовувати в даному винаході, піддавалися модифікації і містять тіолову групу. Деякі таксани, які можуть бути застосовані в даному винаході, мають нижчеприведену формулу T1:



Нижче описано 4 втілення цих нових таксанів.

- У втіленнях (1), (2), (3) і (4)  $R_1$ ,  $R_1'$  і  $R_1''$  є однаковими або різними і позначають H, групу, яка приймає електрони типу F,  $\text{NO}_2$ , CN, Cl,  $\text{CHF}_2$  або  $\text{CF}_3$  або групу, яка віддає електрони, типу - $\text{OCH}_3$ , - $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , - $\text{NR}_7\text{R}_8$ , - $\text{OR}_9$ , де  $R_7$  і  $R_8$  є однаковими або різними і означають лінійні, розгалужені або циклічні алкільні групи, які містять від 1 до 10 атомів вуглецю, або простих або заміщених арильних груп, які містять від 1 до 10 атомів вуглецю. Кращим числом атомів вуглецю у  $R_7$  і  $R_8$  є від 1 до 4. Також бажано  $R_7$  і  $R_8$  є однаковими. Приклади кращих груп - $\text{NR}_7\text{R}_8$  включають диметиламіно, диетиламіно, дипропіламіно і дибутиламіно, причому радикал бутил є первинним, вторинним, третинним або ізобутилом.  $R_9$  позначає лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, який містить від 1 до 10 атомів вуглецю.

$R_1$  переважно позначає  $\text{OCH}_3$ , F,  $\text{NO}_2$  або  $\text{CF}_3$ .

Також бажано  $R_1$  знаходиться в мета-положенні, а  $R_1'$  and  $R_1''$  позначають H або  $\text{OCH}_3$ .

- $R_2$  у втіленнях (1), (2) і (4) позначає H, гетероциклічний, лінійний, розгалужений або циклічний складний ефір, який містить від 1 до 10 атомів вуглецю, або гетероциклічний, лінійний, розгалужений або циклічний простий ефір, який містить від 1 до 10 атомів вуглецю, або карбамат формули - $\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$ , де  $R_{10}$  і  $R_{11}$  є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить від 1 до 6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить від 3 до 10 атомів вуглецю, або простий або заміщений арил, який містить від 6 до 10 атомів вуглецю. Для складних ефірів кращі приклади включають - $\text{COCH}_2\text{CH}_3$  і - $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ . Для складних ефірів кращі приклади включають - $\text{CH}_2\text{CH}_3$  і - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ . Для карбаматів кращі приклади включають - $\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$ , - $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , -CO-морфоліно, -CO-піперазіно

$R_2$  у втіленні (3) позначає групу, яка містить тіол.

- $R_3$  у втіленнях (1), (3) і (4) позначає арил або лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, який містить від 1 до 10 атомів вуглецю, бажано - $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .

$R_3$  у втіленні (2) позначає - $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ .

$R_4$  у всіх 4 втіленнях позначає - $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$  або - $\text{C}_6\text{H}_5$ .

- $R_5$  у втіленнях (1) і (2) позначає групу яка містить тіол, а  $R_6$  має ті ж значення, що і вище для  $R_2$  у втіленнях (1), (2) і (4).

$R_5$  і  $R_6$  у втіленні (3) є однаковими або різними і мають ті ж значення, що і вище для  $R_2$  у втіленнях (1), (2) і (4).

$R_5$  у втіленні (4) має ті ж значення, що і вище для  $R_2$  у втіленнях (1), (2) і (4), а  $R_6$  позначає тіолову групу.

- Кращими положеннями для введення групи, яка містить тіол, є  $R_2$  і  $R_5$ , при цьому найкращим є  $R_2$ .

Бічний ланцюг, який несе тіолову групу, може бути лінійним або розгалуженим, ароматичним або гетероциклічним. Рядовий фахівець зможе легко встановити відповідні бічні ланцюги. Конкретні приклади тіолових груп включають - $(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ , - $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ , - $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SH}$ , -

$\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SH}$ ,  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SH}$ ,  $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ ,  $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{SH}$ ,  $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SH}$ ,  $-\text{CO}$ -морфоліно-XSH,  $-\text{CO}$ -піперазіно-XSH,  $-\text{CO}$ -піперидино-XSH,  $-\text{CO}$ -N-метилпіперазіно-XSH, де

X позначає лінійний алкіл або розгалужений алкіл, який містить 1-10 атомів вуглецю;

5  $\text{R}_{12}$  позначає лінійний алкіл, розгалужений алкіл або циклічний алкіл, який містить 1-10 атомів вуглецю, або простий або заміщений арил, який містить 1-10 атомів вуглецю, або гетероциклічну сполуку, а може бути і H; i

n позначає ціле число від 0 до 10.

Приклади лінійних алкілів включають метил, етил, пропіл, бутил, пентил і гексил.

10 Приклади розгалужених алкілів включають ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, ізопентил і 1-етилпропіл.

Приклади циклічних алкілів включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил.

Приклади простих арилів включають феніл і нафтил.

15 Приклади заміщених арилів включають такі ж арили, які були описані вище, але заміщені алкілами, галогенами типу Cl, Br, F, нітрогрупами, аміногрупами, радикалами сульфокислот, карбонових кислот, гідроксилу або алкоксигруп.

Прикладами гетероциклічних сполук є сполуки, у яких гетероатоми вибрані з поміж O, N і S, і включають морфолін, піперидин, піперазин, N-метилпіперазин, піроліл, піридил, фурил і тіофен.

20 Таксани, які містять тіолову групу, можна синтезувати відомими методами. Вихідним матеріалом для синтезу служить комерційно доступний 10-дезацетилбакатин III. Хімізм введення різних замісників описаний в декількох публікаціях (Ojima et al., J. Med. Chem. 39:3889-3896 (1996); Ojima et al., J. Med. Chem. 40:267-278 (1997); Ojima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4256-4261 (1999); U.S. Patent No. 5,475,011 і U.S. Patent No. 5,811,452).

25 Замісник  $\text{R}_1$  на кільці фенілу і положення замісника  $\text{R}_1$  можна варіювати до тих пір, доки не буде отримана сполука з необхідною токсичністю. Крім того, можна варіювати і ступінь заміщення на кільці фенілу до досягнення необхідної токсичності. Тобто фенільне кільце може містити один або декілька замісників (напр., одноразове, подвійне або потрійне заміщення в кільці фенілу), що служить ще одним способом досягнення необхідної токсичності. Рядовий фахівець зможе визначити належну хімічну групу для  $\text{R}_1$  і належного положення для  $\text{R}_1$  за допомогою лише звичайного експериментування.

30 Наприклад, групи, які приймають електрони, в мета-положенні підвищують цитотоксичний потенціал, тоді як заміщення в пара-положенні навряд чи зможе підвищити потенціал в порівнянні з початковим таксаном. Як правило, потрібно спочатку приготувати декілька репрезентативних таксанів із замісниками в різних положеннях (орто-, мета- і пара-) і провести їх оцінку на цитотоксичність *in vitro*.

35 Тіолову групу можна ввести у одне з тих положень, у яких вже є гідроксильна група. Хімізм блокування різних гідроксильних груп при проведенні реакції з необхідною групою був описаний раніше (наприклад, див. приведені вище посилання). Замісник вводиться просто шляхом перетворення вільної гідроксильної групи на дисульфід, який містить, ефір або складний ефір або дисульфід, який містить, карбамат. Така трансформація здійснюється таким чином. Потрібна гідроксильна група піддається депротонуванню шляхом обробки комерційно доступним реагентом гексаметилдисилазаном літію (1,2 еквівалента) в тетрагідрофурані при 540 °C, як описано в Ojima et al. (1999), *supra*. Після чого, утворений аніон алкоксиду піддається реакції з надлишком дигалосполуки типу диброметану, даючи галоефір. Витіснення галогену за допомогою тіолу (в результаті реакції з тіоацетатом калію і обробки слабкою основою або гідроксиламіном) дає потрібний тіолвмісний таксан.

45 З іншого боку, потрібну гідроксильну групу можна безпосередньо піддати етерифікації в результаті реакції з галоангідридом типу 3-бромпропіонілхлориду, отримуючи складний бромєфір. Витіснення бромі при обробці тіоацетатом і подальша обробка, як описано вище, дає тіолвмісний складний ефір таксану. Кращими таксоїдами є ті, що описані в U.S. Patent Nos. 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; 6,706,708; 7,008,942; 7,217,819 і 7,276,499.

Аналоги CC-1065

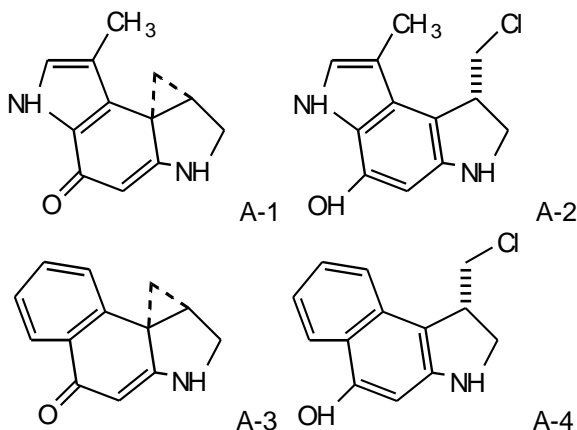
Цитотоксичний агент за даним винаходом може бути і аналогом CC-1065.

55 Відповідно до даного винаходу аналоги CC-1065 містять субодиноцю A і субодиноцю B або B-C. Субодиноця A є CPI (ланкою циклопропілпіроліндолу) у вигляді його природного замкнутого циклопропілу або у вигляді його незамкнутого хлорометилу або близькоспорідненою ланкою CBI (ланка циклопропілбензиндолу) у вигляді замкнутого циклопропілу або у вигляді незамкнутого хлорометилу. Субодиноці B і C у аналогів CC-1065 є дуже схожими і є похідними 2-карбоксііндолу і 2-карбоксібенозофурану. Для активності аналогів CC-1065 потрібна щонайменше одна така 2-карбоксііндольна субодиноця або 2-карбоксібенозофуранова

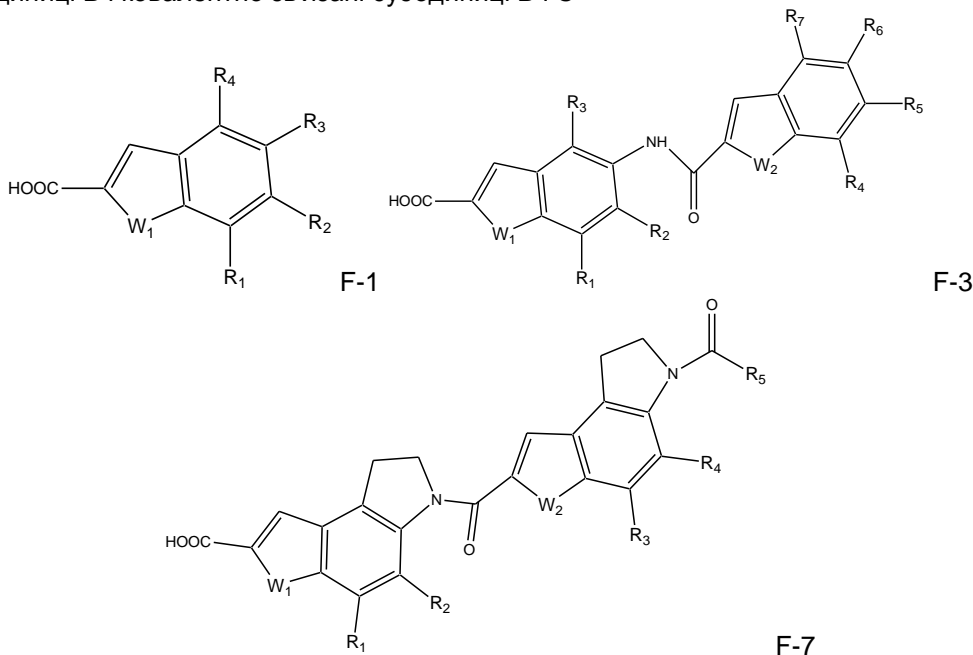
субодинаця, хоча дві субодинаці (тобто В-С) роблять аналог активнішим. Як видно з природного СС-1065 і опублікованих аналогів (напр., Warpehoski et al., J. Med. Chem. 31:590-603 (1988); Boger D. et al., J. Org. Chem. 66; 6654-6661, 2001; U.S. Patent Nos. 5,739,350; 6,060,608; 6,310,209), субодинаці В і С також можуть нести і різні замісники в різних положеннях на кільцях індолу або бензофурану.

Аналоги СС-1065, які містять тіолову групу, можуть бути будь-якою з наступних субодинаць А формули А-1 {CPI (циклопропілова форма)}, А-2 {CPI (хлорометилова форма)}, А-3 {CBI (циклопропілова форма)} або А-4 {CBI (хлорометилова форма)}, ковалентно сполучених через амідний зв'язок від вторинної аміногрупи групи піролу субодинаці А з карбоксигрупою С-2 субодинаці В формули F-1 або субодинаці В-С формули F-3 або F-7.

Субодинаці А



Субодинаці В і ковалентно зв'язані субодинаці В і С



де:  $W_1$  і  $W_2$  всі можуть бути однаковими або різними і можуть означати О або NH; і

$R_4$  у формулі F-1 позначає тіолову групу, один з  $R$  або  $R_4$  у формулі F-3 позначає тіолову групу, один з  $R'$  або  $R_4$  у формулі F-7 позначає тіолвмісну групу; при цьому, якщо  $R$  або  $R'$  – тіолова група, то  $R_1$ – $R_6$ , які можуть бути однаковими або різними, є воднем,  $C_1$ – $C_3$ -лінійним алкілом, метокси, гідроксиллом, первинною аміногрупою, вторинною аміногрупою, третинною аміногрупою або амідогрупою, а якщо  $R_4$  – тіолова група, то  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  і  $R_6$ , які можуть бути однаковими або різними, є воднем,  $C_1$ – $C_3$ -лінійним алкілом, метокси, гідроксиллом, первинною аміногрупою, вторинною аміногрупою, третинною аміногрупою або амідогрупою, а  $R'$  позначає  $NH_2$ , алкіл, О-алкіл, первинну аміногрупу, вторинну аміногрупу, третинну аміногрупу або амідогрупу. Крім того, атом хлору в субодинацях А-2 і А-4 може бути замінений іншим відповідним галогеном.

У кращому втіленні  $R$  і  $R'$  позначають тіолові групи, а  $R_1$  і  $R_2$  позначають водень. У іншому кращому втіленні  $R$  і  $R'$  позначають тіолові групи, а  $R_1$ – $R_6$  всі позначають водень.

У найкращому втіленні R або R<sub>4</sub> позначає -NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH, -NHCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH або -O(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH, а R' позначає -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH або -O(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>SH, де l позначає ціле число від 1 до 10.

Приклади первинних амінів включають метиламін, етиламін і ізопропіламін.

5 Приклади вторинних амінів включають диметиламін, диетиламін і етилпропіламін.

Приклади третинних амінів включають триметиламін, триетиламін і етилізопропілметиламін.

Приклади амідогруп включають N-метилацетамідо, N-метилпропіонамідо, N-ацетамідо і N-пропіонамідо.

10 Приклади алкілів, представлених R', якщо R' не є зв'язуючою групою, включають C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-лінійні або розгалужені алкіли.

Приклади O-алкілів, представлених R', якщо R' не є зв'язуючою групою, включають сполуки, у яких алкільна частина є C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-лінійним або розгалуженим алкілом.

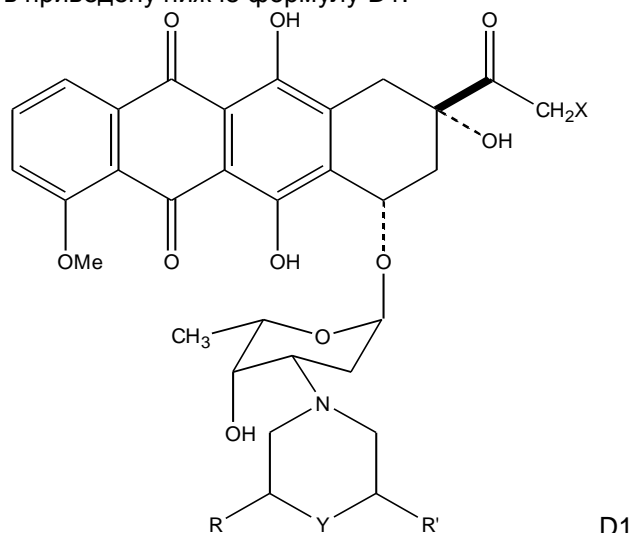
15 Вищеописані аналоги CC-1065 можуть бути виділені з природних джерел, а методи їх отримання, що включають подальші модифікації, методи синтезу або з'єднання тих і інших, добре описані (напр., див. U.S. Patent Nos. 5,475,092, 5,585,499 і 5,846,545). Кращими аналогами CC-1065 є ті з поміж них, які описані в U.S. Patent Nos. 5,475,092; 5,595,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,586,618; 6,756,397 і 7,049,316.

Аналоги даунорубіцину/доксорубіцину

20 Цитотоксичний агент за даним винаходом може бути і аналогом даунорубіцину або аналогом доксорубіцину.

Аналоги даунорубіцину і доксорубіцину відповідно до даного винаходу можуть бути модифіковані з тим, щоб вони містили тіолову групу.

Модифіковані аналоги доксорубіцину/даунорубіцину, які можуть бути застосованими в даному винаході, мають приведену нижче формулу D1:



25 де: X позначає H або OH;

Y позначає O або NR<sub>2</sub>, де R<sub>2</sub> позначає лінійний або розгалужений алкіл, який містить від 1 до 5 атомів вуглецю;

30 R позначає тіолову групу, H або лінійний або розгалужений алкіл, який містить від 1 до 5 атомів вуглецю; і

R' позначає тіолову групу, H або -OR<sub>1</sub>, де R<sub>1</sub> позначає лінійний або розгалужений алкіл, який містить від 1 до 5 атомів вуглецю;

за умови, що R і R' не означають тіолові групи одночасно.

У кращому втіленні NR<sub>2</sub> є NCH<sub>3</sub>. У іншому кращому втіленні R' позначає -O.

35 У найкращому втіленні тіолова група є -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SH, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(CH<sub>3</sub>)SH, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(CH<sub>3</sub>)SH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SH або -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SH де n позначає ціле число від 0 до 10.

40 Приклади лінійних або розгалужених алкілів, які містять від 1 до 5 атомів вуглецю, представлених R, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub>, включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил і пентил в будь-якій з його 8 ізомерних структур.

Бажано R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> означають метил.

Приклади лінійних алкілів включають метил, етил, пропіл, бутил, пентил і гексил.

Приклади розгалужених алкілів включають ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, ізопентил і 1-етилпропіл.



Якщо R або R' не є зв'язуючою групою, то замісник в цьому положенні можна варіювати до тих пір, поки не буде отримана сполука з необхідною токсичністю. Висока токсичність визначається як значення IC<sub>50</sub> відносно культури ракових клітин в інтервалі від 1×10<sup>-12</sup> до 1×10<sup>-9</sup> М при дії протягом 72 год. Репрезентативними є приклади замісників – Н, алкіл і О-алкіл, як

описано вище. Рядовий фахівець зможе визначити належну хімічну групу для R і R' за допомогою лише звичайного експериментування.

Наприклад, заміщаючі групи – метил і метокси повинні підвищувати цитотоксичний потенціал, тоді як водень навряд чи зможе підвищити потенціал в порівнянні з вихідною сполукою. Потрібно спочатку приготувати аналоги із замісниками в різних положеннях і

провести їх оцінку на цитотоксичність *in vitro*.

Модифіковані аналоги доксорубіцину/даунорубіцину, які містять тіолову групу, описані в WO 01/38318. Модифіковані аналоги доксорубіцину/даунорубіцину можна синтезувати відповідно до відомих методів (напр., див. U.S. Patent No. 5,146,064).

Ауристатини включають ауристатин Е, ауристатин ЕВ (АЕВ), ауристатин ЕФР (АЕФР), монометилауристатин Е (ММАЕ), які описані в U.S. Patent No. 5,635,483, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, no. 8, pp. 921-932 (2004); U.S. Patent Application No. 11/134826, U.S. Patent Publication Nos. 2006/0074008, 2006/022925.

Цитотоксичні агенти, відповідно до даного винаходу, включають димери піролобензодіазепіну, відомі в цій галузі (U.S. Patent Nos. 7,049,311; 7,067,511; 6,951,853; 7,189,710; 6,884,799; 6,660,856).

Аналоги і похідні

Фахівці в галузі цитотоксичних речовин повинні розуміти, що кожна з описаних тут цитотоксичних речовин може бути модифікована таким чином, що утворена сполука, збереже специфічність і/або активність початкової сполуки. Фахівці також повинні розуміти, що багато з цих сполук можна використовувати замість описаних тут цитотоксичних речовин. Таким чином, цитотоксичні речовини даного винаходу включають аналоги і похідні описаних в ньому сполук.

Терапевтичне застосування

Кон'югати клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами (напр., імунокон'югати) можна застосовувати і в комбінації з іншими засобами хіміотерапій. Такі засоби хіміотерапій перераховані вище або описані в U.S. Patent No. 7,303,749.

Кон'югати клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами (напр., імунокон'югати) відповідно до даного винаходу можна вводити *in vitro*, *in vivo* і/або *ex vivo* для лікування пацієнтів і/або для модуляції росту вибраних популяцій клітин, включаючи, наприклад, рак легенів, крові, плазми, молочної залози, товстої кишки, простати, нирок, підшлункової залози, мозку, кісток, яєчників, яєчок і лімфатичних органів; аутоімунні захворювання, такі як системний вовчак, ревматоїдний артрит і множинний склероз; відторгнення трансплантатів, такі як відторгнення ниркових трансплантатів, відторгнення легеневих трансплантатів, відторгнення серцевих трансплантатів і відторгнення трансплантатів кісткового мозку; реакції відторгнення; вірусні інфекції, такі як зараження CMV, зараження ВІЧ і СНІД; і паразитарні інфекції, такі як жиардіаз, амебіаз, шистосомоз та ін. Бажано імунокон'югати і засоби хіміотерапій за даним винаходом вводяться *in vitro*, *in vivo* і/або *ex vivo* для лікування раку у пацієнтів і/або для модуляції росту ракових клітин, зокрема раку крові, плазми, легенів, молочної залози, товстої кишки, простати, нирок, підшлункової залози, мозку, кісток, яєчників, яєчок і лімфатичних органів; бажано раку легенів, простати, плазми, крові або товстої кишки.

«Модуляцію росту вибраних популяцій клітин» включає інгібування проліферації вибраних популяцій клітин (напр., популяцій клітин множинної мієломи, зокрема клітин MOLP-8, клітин OPM2, клітин H929 та ін.), тобто ділення з утворенням більшої кількості клітин; зменшення швидкості росту ділення клітин у порівнянні, наприклад, з необробленими клітинами; знищення вибраних популяцій клітин; і/або запобігання метастазуванню вибраних популяцій клітин (типу ракових клітин). Ріст вибраних популяцій клітин можна модулювати *in vitro*, *in vivo* або *ex vivo*.

У способах даного винаходу кон'югати клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами (напр., імунокон'югати) можна вводити *in vitro*, *in vivo* або *ex vivo*. Кон'югати клітинозв'язувальних речовин з препаратами (напр., імунокон'югати) можна застосовувати разом з відповідними фармацевтично прийнятними носіями, розчинниками і/або наповнювачами, які добре відомі і можуть бути встановлені фахівцем виходячи із клінічної ситуації. Приклади відповідних носіїв, розчинників і/або наповнювачів включають: (1) фізіологічний розчин Дюльбеко з фосфатним буфером рН 6,5, який може містити від 1 до 25 міліграмів/мл сироваткового альбуміну людини; (2) 0,9% фізіологічний розчин (0,9% мас. NaCl); і (3) 5% мас. декстрозу.

Сполуки і композиції, описані в даному винаході, можна вводити у відповідному вигляді,

бажано парентерально, краще внутрішньовенно. Для парентерального введення сполуки і композиції можуть бути водними або не водними стерильними розчинами, суспензіями або емульсіями. Як розчинник або носій можна використовувати пропіленгліколь, рослинну олію і органічні складні ефіри для ін'єкцій типу етилолеату. Композиції також можуть містити допоміжні речовини, емульгатори або диспергатори.

Композиції також можуть мати вигляд стерильних твердих композицій, які можна розчиняти або диспергувати в стерильній воді або будь-якому іншому стерильному середовищі для ін'єкцій.

«Терапевтично ефективна кількість» описаного кон'югата клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом (напр., імунокон'югата) відноситься до схеми дозування для модуляції росту вибраних популяцій клітин і/або лікування захворювання пацієнта і вибирається відповідно до цілого ряду факторів, включаючи вік, вагу, стать, дієту і медичний стан пацієнта, тяжкість захворювання, спосіб застосування і такі фармакологічні міркування, як активність, ефективність, фармакокінетичний і токсикологічний профіль конкретної сполуки. «Терапевтично ефективну кількість» також можна визначити, звертаючись до стандартної медичної допомоги типу «Настільного довідника лікаря 2004». Пацієнтами бажано є тварини, краще ссавці, найкраще людина. Пацієнти можуть бути чоловічої або жіночої статі, немовлятами, дітьми або дорослими.

Приклади відповідних методик введення кон'югатів клітинозв'язувальних речовин з лікарськими препаратами (напр., імунокон'югатів) наступні. Кон'югати можна вводити щодня впродовж 5 днів болюсом внутрішньовенно раз на день або безперервним вливанням протягом 5 днів.

Як альтернатива кон'югати можна вводити раз на тиждень впродовж 6 тижнів або довше. З іншого боку, кон'югати можна вводити раз на 2 або 3 тижні. Дози болюсом вводяться в 50-400 мл нормального фізіологічного розчину, в які можна додати 5-10 мл сироваткового альбуміну людини. Безперервне вливання проводиться в 250-500 мл нормального фізіологічного розчину, в які можна додати 25-50 мл сироваткового альбуміну людини, впродовж 24 годин. Дозування повинне складати від 10 нг до 1000 міліграм/кг на людину, внутрішньовенно (у межах від 100 нг до 100 міліграм/кг).

Приблизно через 1-4 тижні після обробки можна проводити другий курс лікування пацієнта. Конкретні клінічні методики відносно способу застосування, наповнювачів, розчинників, дозування і термінів можуть бути встановлені фахівцем виходячи із клінічної ситуації.

Даним винаходом також передбачені фармацевтичні набори, які включають один або декілька контейнерів, заповнених одним або декількома інгредієнтами фармацевтичних сполук і/або композицій даного винаходу, включаючи один або декілька імунокон'югатів і один або декілька засобів хіміотерапії. Такі набори можуть включати, наприклад, також інші сполуки і/або композиції, пристрої для введення сполук і/або композицій і письмові інструкції у вигляді, встановленому урядовою установою, компетентною у галузі регулювання виготовлення, застосування і продажу фармацевтичних або біологічних препаратів.

Сполуки і кон'югати (напр., імунокон'югати) також можуть застосовуватися для виготовлення медикаментів, які можуть бути застосованими для лікування або зменшення тяжкості таких захворювань, які характеризуються аномальним ростом клітин (напр., раки).

Терапія ракових захворювань і дозування, способи застосування і призначення добре відомі і описані в літературі типу «Настільного довідника лікаря» (PDR; Physician's Desk Reference). У PDR приведені дозування засобів, які застосовувалися при лікуванні ракових захворювань. Схеми дозувань і дозування вищенаведених засобів хіміотерапії і кон'югатів, які є терапевтично ефективними, залежать від конкретного ракового захворювання, тяжкості захворювання та інших факторів, відомих кваліфікованим лікарям, і можуть бути встановлені лікарем. Наприклад, в «Настільному довіднику лікаря» за 2006 р. повідомляється, що таксотер (див. с. 2947) є інгібітором деполімеризації тубуліну, доксорубіцин (див. с. 786), доксил (див. с. 3302) і оксалиплатин (див. с. 2908) взаємодіють з ДНК, іринотекал (див. с. 2602) є інгібітором топоізомерази I, ербитукс (див. с. 937) і тарцева (див. с. 2470) взаємодіють з рецепторами фактора росту епідермісу. Зміст PDR прямо включений до даного винаходу у повному обсязі як посилання. Фахівець в цій галузі може проглянути PDR, використовуючи один або декілька з наступних параметрів, щоб визначити схеми дозувань і дозування засобів хіміотерапії і кон'югатів, які можуть бути використані відповідно до положень даного винаходу. Ці параметри включають:

1. Зведений показник

а) щодо виробників

б) щодо препаратів (за фірмовими назвами або торговими марками препаратів)

с) за категоріями (наприклад, «антигістамін», «ДНК-алкілюючі речовини», «таксани» тощо)  
 d) генеричний/хімічний показник (за загальноприйнятими назвами препаратів, а не торговими марками)

2. Кольорові зображення ліків

5 3. Інформація про препарати відповідно до маркування FDA

a) хімічна інформація

b) функція/дія

c) показання і протипоказання

d) випробування, побічні ефекти, попередження.

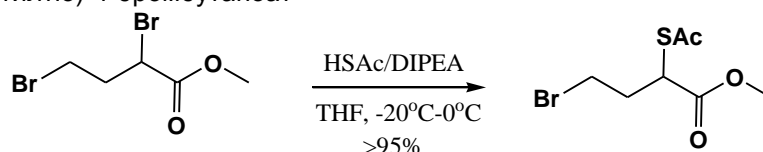
10 Всі посилання, приведені в описі і нижченаведених прикладах, безпосередньо включені шляхом посилання у всьому обсязі.

Приклади

Далі винахід буде описаний на необмежуваних прикладах. Якщо не вказано інакше, всі відсотки і долі виражені за об'ємом.

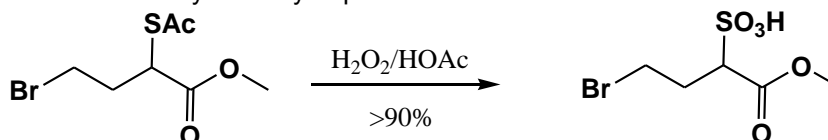
15 Приклад 1. Матеріали і методи

Метил-2-(ацетилтіо)-4-бромбутаноат



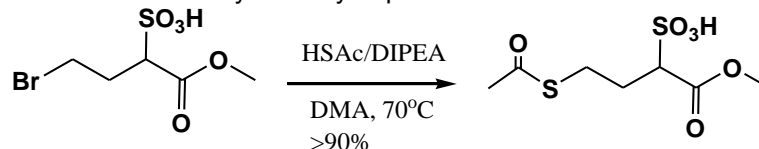
10,0 г (38,4 ммоль) метил-2,4-дибромбутаноату в 100 мл безводного THF при 20 °C краплями вносили до суміші з 2,75 мл (38,5 ммоль) тіооцтової кислоти в 8,5 мл (48,9 ммоль) DIPEA і 50 мл безводного THF протягом 1,5 год. Після перемішування протягом ночі при 520 °C, а потім при 0 °C протягом 2 год. в атмосфері Ar суміш концентрували, розбавляли сумішшю EtAc/гексан, промивали 1,0 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували, випаровували і піддавали хроматографічному очищенню в SiO<sub>2</sub> (EtAc/гексан від 1:12 до 1:10), отримуючи 9,5 г (96%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 4.38 (1H, t, J = 7.1 Гц), 3.74 (s, 3H), 3.40 (m, 2H), 2.57-2.47 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.36-2.21 (m, 1H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 193.24, 171.36, 53.15, 44.45, 34.67, 30.46, 29.46. MS: m/z+ 276.9 (M+Na), 278.9 (M<sup>+</sup>+Na).

4-Бром-1-метокси-1-оксобутан-2-сульфонова кислота



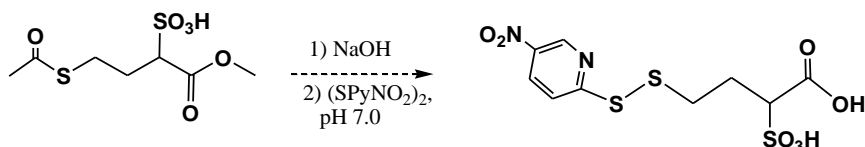
9,2 г (36,3 ммоль) метил-2-(ацетилтіо)-4-бромбутаноату у 80 мл оцтової кислоти вносили до 40 мл перекису водню (35% у воді). Суміш перемішували протягом ночі, а потім випаровували, розбавляли водою, нейтралізували NaHCO<sub>3</sub>, промивали сумішшю 1:1 гексан/EtAc. Водний розчин випаровували, розчиняли в метанолі, концентрували і піддавали кристалізації в суміші метанол/толуол, отримуючи 8,6 г (вихід = 90%) вказаної в заголовку сполуки. Т.пл. = 288~293 °C (розл.). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 4.12 (dd, 1H, J = 4.8, 9.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 2.54 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 172.16, 66.73, 55.66, 33.39, 32.70. MS: m/z- 260.8 (M-1).

4-(Ацетилтіо)-1-метокси-1-оксобутан-2-сульфонова кислота



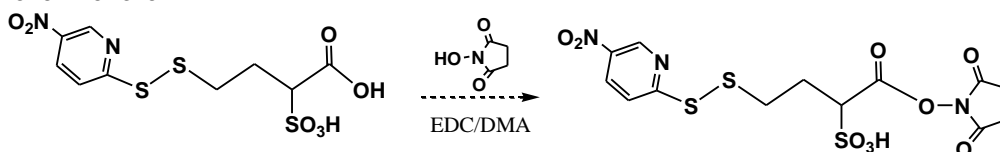
5,0 г (19,2 ммоль) 4-бром-1-метокси-1-оксобутан-2-сульфонової кислоти в 100 мл THF вносили до 3,0 мл тіооцтової кислоти і 9,0 мл DIPEA в 100 мл THF. Суміш перемішували протягом ночі, а потім кип'ятили при 70 °C протягом 1 год., випаровували і знову випаровували з 3×100 мл води після нейтралізації до pH 7 за допомогою NaHCO<sub>3</sub>. Суміш розчиняли в метанолі, фільтрували крізь целіт, концентрували і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/НСООН від 37,5:250:1 до 50:250:1), отримуючи 4,4 г (вихід = 90%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 3.95 (dd, 1H, J = 4.1, 10.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.22 (dd, 2H, J = 7.4, 14.9 Hz), 2.39 (s, 3H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 203.88, 172.91, 67.32, 56.17, 29.04, 20.61. MS: m/z- 254.8 (M-H).

4-((5-Нітропіридин-2-іл)дисульфаніл)-2-сульфобутанова кислота



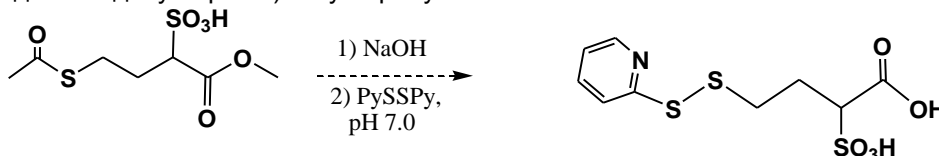
3,0 г (11,7 ммоль) 4-(ацетилтію)-1-метокси-1-оксобутан-2-сульфонової кислоти в 100 мл води вносили до 50 мл 3 М NaOH. Після перемішування в атмосфері Ar протягом 3 год. суміш нейтралізували 1 М H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> до pH 7,2 в атмосфері Ar. Суміш додавали краплинами в розчин 10,0 г (32,2 ммоль) 1,2-біс(5-нітропіридин-2-іл) дисульфану в 200 мл DMA. Після перемішування протягом 4 год. в атмосфері Ar суміш концентрували, розбавляли водою, фільтрували, випаровували і очищали на колонці C-18 4,0×20 см (елюювали сумішшю вода/метанол 95:5), отримуючи 3,1 г (вихід = 75%) вказаної в заголовку сполуки. Т.пл. = 288~291 °С (розл.). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 9.29 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.63 (dd, 1H, J = 2.7, 8.9 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 3.73 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 3.22-3.17 (m, 1H), 3.15-3.10 (m, 1H), 2.41-2.33 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 170.92, 169.10, 146.04, 143.67, 133.65, 120.72, 64.22, 37.82, 29.26. MS: m/z- 352.8 (M-H).

1-(2,5-Диокспіролідін-1-ілокси)-4-((5-нітропіридин-2-іл)дисульфаніл)-1-оксобутан-2-сульфонова кислота



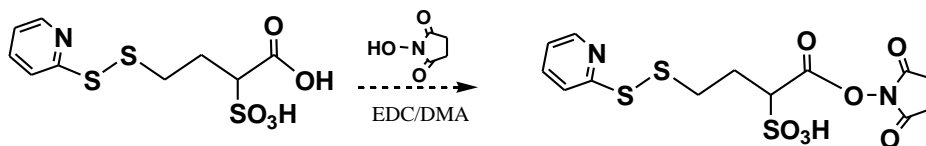
220 міліграм (0,62 ммоль) 4-((5-нітропіридин-2-іл)дисульфаніл)-2-сульфобутанової кислоти в 15 мл DMA вносили до 130 міліграм (1,13 ммоль) NHS і 480 міліграм (2,50 ммоль) EDC. Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, випаровували і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/HCOOH від 10000:1000:1 до 10000:1500:1), отримуючи 227 міліграм (вихід = 82%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 9.25 (d, 1H, J = 5.2 Hz), 8.57 (dd, 1H, J = 2.5, 8.9 Hz), 8.04 (t, 1H, J = 8.0 + 8.9 Hz), 3.86 (dd, 1H, J = 4.9, 9.7 Hz), 3.13-3.12 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 2.36-2.30 (m, 1H), 2.25-2.21 (m, 1H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 166.96, 165.01, 144.93, 142.26, 132.63, 119.61, 61.00, 35.03, 29.30, 25.39. MS: m/z- 449.8 (M-H).

4-(Піридин-2-ілдисульфаніл)-2-сульфобутанової кислоти



1,5 г (5,85 ммоль) 4-(ацетилтію)-1-метокси-1-оксобутан-2-сульфонової кислоти вносили до 100 мл 0,5 М розчину NaOH. Після перемішування в атмосфері Ar протягом 3 год. суміш концентрували до ~50 мл і нейтралізували 1 М H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> до pH 7,2 в атмосфері Ar. Суміш додавали краплинами в розчин 4,0 г (18,1 ммоль) 2,2'-дитіопіридину в 60 мл DMA. Після перемішування протягом 4 год. в атмосфері Ar суміш концентрували, розбавляли водою, фільтрували, випаровували і очищали на колонці C-18 4,0×20 см (елюювали сумішшю вода/метанол від 99:1 до 90:10), отримуючи 1,32 г (вихід = 73%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 8.39 (dd, 1H, J = 3.5, 4.8 Hz), 7.86 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H, J = 5.2, 9.4 Hz), 2.90 (m, 2H), 2.28 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 172.60, 159.16, 148.93, 138.09, 121.03, 119.38, 67.49, 36.39, 28.666. MS: m/z- 307.8 (M-H).

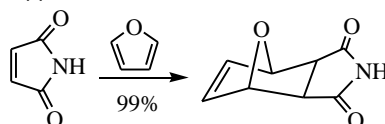
1-(2,5-Диокспіролідін-1-ілокси)-1-оксо-4-(піридин-2-ілдисульфаніл)бутан-2-сульфонова кислота



680 міліграм (2,20 ммоль) 4-(піридин-2-ілдисульфаніл)-2-сульфобутанової кислоти в 50 мл DMA вносили до 300 міліграм (2,60 ммоль) NHS і 800 міліграм (4,16 ммоль) EDC. Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, випаровували і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/HCOOH від 10000:1000:1 до 10000:1500:1), отримуючи 720 міліграм (вихід = 80%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.40 (dd, 1H, J = 3.5, 4.7 Hz), 7.85 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 3.58 (dd, 1H, J = 5.1, 9.4 Hz), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.31-2.27 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 168.16, 161.11, 147.91, 139.22, 121.63, 119.31, 66.80,

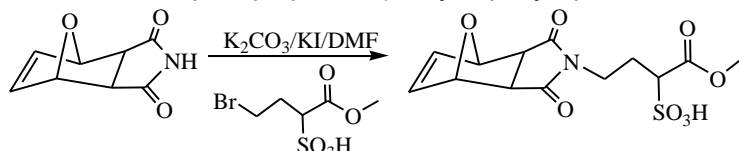
36.30, 28.36, 25.42. MS: m/z- 404.9 (M-H).

3,6-Ендоксо-Δ-тетрагідрофталід



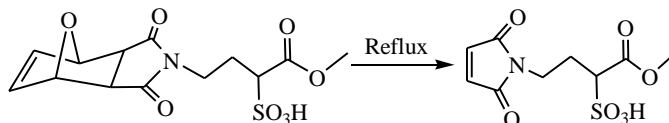
Малеїмід (5,0 г, 51,5 ммоль) в етиловому ефірі (200 мл) вносили до фурану (5,5 мл, 75,6 ммоль). Суміш нагрівали в бомбі автоклава на 1 л при 100 °С протягом 8 год. Бомбу охолоджували до кімнатної температури, а речовину, яка знаходиться усередині, промивали метанолом, концентрували і піддавали кристалізації в суміші етилацетат/гексан, отримуючи 8,4 г (99%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 11.08 (s, 1H) (NH), 6.60 (m, 2H), 5.16 (m, 2H), 2.95 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 178.84, 137.69, 82.00, 49.92. MS: m/z+ 188.4 (M+Na).

Метил-4-N-(3,6-ендоксо-Δ-тетрагідрофталідо)-2-сульфобутират



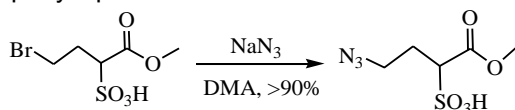
3,6-Ендоксо-Δ-тетрагідрофталід (0,80 г, 4,85 ммоль) в DMA (20 мл) вносили до K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,4 г, 10,13 ммоль) і KI (0,19 г, 1,14 ммоль). Після перемішування в атмосфері Ar протягом 1 год. додавали метил-4-бром-2-сульфобутират (0,98 г, 3,77 ммоль) в DMA (10 мл). Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, випаровували, розчиняли в 1% HAc в метанолі, фільтрували, випаровували і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HAc від 1:5:0,01 to 1:4:0,01), отримуючи 0,98 г (75%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 6.59 (m, 2H), 5.16 (dd, 2H, J = 0.8, 7.8 Hz), 3.65-3.63 (m, 3H), 3.47 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.83 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 172.94, 162.86, 137.68, 81.98, 52.39, 49.91, 48.58, 36.01, 21.97. MS: m/z- 343.9 (M-H).

Метил-4-N-малеїмідо-2-сульфобутират



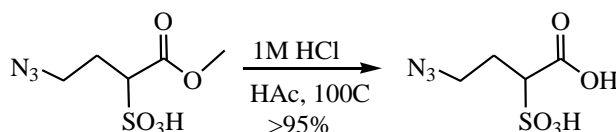
У відкритій круглодонній колбі нагрівали метил-4-N-(3,6-ендоксо-Δ-тетрагідрофталідо)-2-сульфобутират (0,30 г, 0,87 ммоль) у 20 мл суміші 1:1 DMA/100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 при 120–140 °С протягом 4 год. Під час реакції поступово додавали 5×10 мл води, щоб підтримувати реакційний об'єм близько 15 мл. Суміш випаровували насухо і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HAc від 1:5:0,01 to 1:4:0,01), отримуючи 0,230 г (95%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 6.60 (s, 2H), 4.06 (d, 1H), 3.60 (m, 3H), 3.47 (m, 2H), 2.43 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 171.59, 164.96, 136.10, 66.20, 51.71, 34.82, 22.10. MS: m/z- 276.6 (M-H).

Метил-4-азидо-2-сульфобутират



Метил-4-бром-2-сульфобутират (1,07 г, 4,11 ммоль) і азид натрію (0,70 г, 10,7 ммоль) в DMF (50 мл) перемішували протягом ночі. Суміш випаровували і очищали методом хроматографії в SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HAc 1:5:0,01), а потім піддавали кристалізації в суміші CH<sub>3</sub>OH/толуол/гексан, отримуючи 1,00 г (95%) вказаної в заголовку сполуки. Т.пл. = 267-272 °С (розл.). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMF-d<sub>7</sub>): 12.06 (br, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.59 (dd, 1H, J = 5.4, 8.9 Hz), 3.47 (m, 2H), 2.24 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 171.10, 64.29, 52.24, 50.64, 21.35. ESI MS: m/z+ 267.9 (M+2Na-H), m/z- 222.0 (M-H); HRMS: m/z- (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S-H) теор. 222.0185, факт. 222.0179.

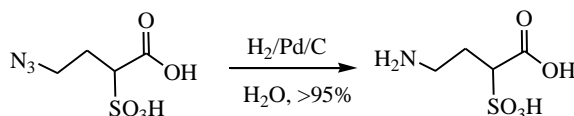
4-Азидо-2-сульфоолійна кислота



Метил-4-азидо-2-сульфобутират (1,00 г, 4,08 ммоль) в суміші HCl (50 мл, 1,0 M) і HAc (5 мл) нагрівали при 100 °С протягом 8 год. Суміш випаровували і знову випаровували з 3×50 мл води,

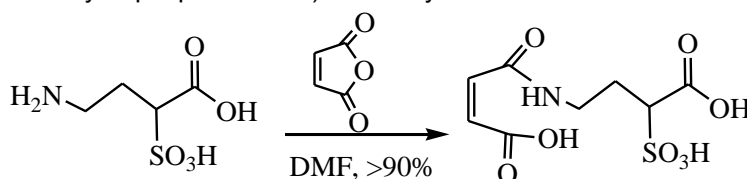
а потім піддавали кристалізації в суміші вода/ацетон, отримуючи 1,0 г (99%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 3.60 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 2.24 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 170.96, 63.04, 50.66, 29.12. ESI MS: m/z- 207.7 (M-H); HRMS: m/z- ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5\text{S-H}$ ) теор. 208.0028, факт. 208.0021.

5 4-Аміно-2-сульфоолійна кислота



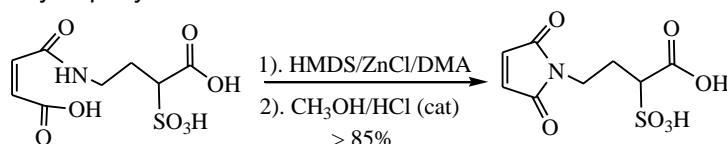
У гідрогенізаційний качалочний посуд на 250 мл вносили 4-азидо-2-сульфоолійну кислоту (500 міліграм, 2,40 ммоль), воду (20 мл) і Pd/C (110 міліграм, 10% Pd, 50% у вологому стані). Після того, як повітря з посудини було відкачане під вакуумом, в посудину подавали водень при 20 psi. Суміш струшували протягом 8 год., після чого фільтрували крізь целіт, промивали DMF, випаровували і знову випаровували з безводним DMF, отримуючи 476 міліграм (91% солі HCl) вказаного в заголовку продукту. ESI MS: m/z- 181.8 (M-H). Цей продукт використовували безпосередньо без подальшого очищення.

(Z)-4-(3-Карбокси-3-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнова кислота



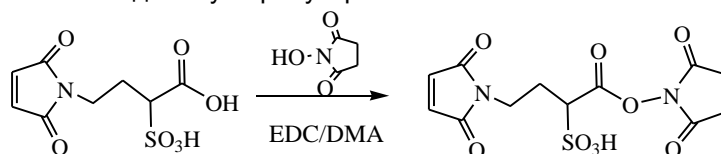
До вищенаведеної HCl-солі 4-аміно-2-сульфоолійної кислоти (476 міліграм, 2,16 ммоль) в безводному DMF (20 ml) додавали малеїновий ангідрид (232 міліграми, 2,36 ммоль). Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, випаровували і очищали на заповненій колонці C-18  $\phi 1,0 \times 25$  см, елюючи водою. Фракції, які містять продукт, об'єднували, випаровували і піддавали кристалізації в суміші  $\text{H}_2\text{O}$ /ацетон, отримуючи 552 міліграми (91%) вказаного в заголовку продукту.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 9.70 (br, 1H), 6.73 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 6.32 (d, 1H, J = 12.8 Hz), 3.69 (m, 1H), 3.47 (m, 2H), 2.27 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 171.47, 167.32, 165.87, 135.44, 133.07, 63.82, 39.13, 27.62. ESI MS: m/z- 279.8 (M-H); HRMS: m/z- ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_8\text{S-H}$ ) теор. 280.0127, факт. 280.0121.

4-N-Малеїмідо-2-сульфобутанова кислота



(Z)-4-(3-Карбокси-3-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнову кислоту (310 міліграм, 1,10 ммоль) нагрівали в суміші безводного DMA (5 мл) і безводного толуолу (20 мл). Після того, як температура досягла 80 °C, додавали HMDS (гексаметилдисилазан) (1,40 мл, 6,71 ммоль) і  $\text{ZnCl}_2$  (1,85 мл, 1,0 M в діетиловому ефірі, 1,85 ммоль). Суміш продовжували нагрівати до 115–125 °C і збирали толуол пасткою Dean-Stark. Реакційну суміш кип'ятили при 120 °C протягом 6 год. За цей час додавали 2×20 мл безводного толуолу, щоб підтримати об'єм суміші близько 8–10 мл. Потім суміш охолоджували, додавали 1 мл суміші 1:10 конц. HCl/ $\text{CH}_3\text{OH}$ , випаровували і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елювали сумішшю  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  від 1:5:0,01 до 1:4:0,01), отримуючи 260 міліграм (92%) вказаного в заголовку продукту.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 10.83 (br, 1H), 6.95 (s, 2H), 1H, J = 12.8 Hz), 3.65 (m, 1H), 3.54 (m, 2H), 2.27 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.61, 172.04, 135.47, 64.18, 37.1, 27.89. ESI MS: m/z- 261.8 (M-H); HRMS: m/z- ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_7\text{S-H}$ ) теор. 262.0021, факт. 262.0027.

Сукцинімідил-4-N-малеїмідо-2-сульфобутират

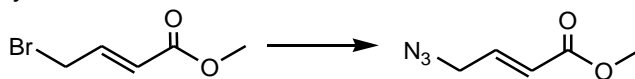


4-N-Малеїмідо-2-сульфобутанову кислоту (260 міліграм, 0,99 ммоль) в DMA (10 мл) вносили до NHS (220 міліграм, 1,91 ммоль) і EDC (500 міліграм, 2,60 ммоль). Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, випаровували і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елювали

сумішшю  $\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HAc}$  від 10000:1000:1 до 10000:2000:1), а потім піддавали кристалізації в суміші  $\text{DMA}/\text{EtAc}/\text{гексан}$ , отримуючи 285 міліграм (вихід = 81%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 6.99 (s, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.34 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 171.97, 171.82, 166.64, 135.58, 62.00, 36.66, 26.62. ESI MS: m/z- 358.9 (M-H); HRMS: m/z- ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_9\text{S-H}$ ) теор. 359.0185, факт. 359.0178.

5

(E)-Метил-4-азидобут-2-еноат

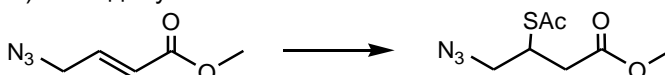


У розчин  $\text{NaN}_3$  (2,80 г, 43,01 ммоль) в 100 мл  $\text{DMF}$  при  $520^\circ\text{C}$  додавали метил-4-бромкротоноат (5,00 мл, 85%, 36,10 ммоль). Після перемішування при  $520^\circ\text{C}$  протягом 30 хв. суміш перемішували при  $0^\circ\text{C}$  протягом 4 год., випаровували, суспендували в суміші  $\text{EtAc}/\text{гексан}$  (1:1), фільтрували, випаровували і піддавали хроматографічному очищенню на колонці з  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{EtAc}/\text{гексан}$  від 1:25 до 1:10), отримуючи 4,08 г (80%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.88 (m, 1H), 6.06 (ddd, 1H,  $J = 1.7, 3.4, 15.6$  Hz), 3.97 (dd, 2H,  $J = 1.2, 4.96$  Hz), 3.73 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 166.23, 140.86, 123.49, 51.95, 51.36. ESI MS: m/z+ 182.5 (M+Na+H<sub>2</sub>O); HRMS: m/z+ ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$ ) теор. 182.0542, факт. 182.0548.

10

15

Метил-3-(ацетилтіо)-4-азидобутаноат

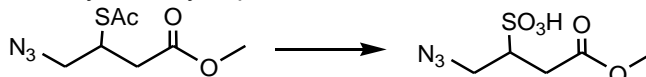


До розчину (E)-метил-4-азидобут-2-еноату (4,00 г, 28,37 ммоль) у 60 мл  $\text{THF}$  при  $0^\circ\text{C}$  додавали суміш тіооцтової кислоти (3,0 мл, 42,09 ммоль) і  $\text{DIPEA}$  (8,0 мл, 45,92 ммоль) в 60 мл  $\text{THF}$  протягом 20 хв. Після перемішування при  $0^\circ\text{C}$  протягом 1 год. суміш перемішували за кімнатної температури протягом ночі, випаровували, розчиняли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , промивали  $\text{NaHCO}_3$  (насич.) і 1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$  (насич.) рН 4, відповідно, сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фільтрували, випаровували і піддавали хроматографічному очищенню на колонці з  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{EtAc}/\text{гексан}$  від 1:8 до 1:4), отримуючи 4,98 г (81%) вказаного в заголовку продукту.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.66 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.40 (dd, 1H,  $J = 7.5, 12.7$  Hz), 3.31 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 192.20, 172.48, 56.56, 53.60, 51.31, 34.58, 30.56. ESI MS: m/z+ 240.0 (M+Na), 255.9 (M+K); HRMS: m/z+ ( $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} + \text{Na}$ ) теор. 240.0419, факт. 240.0415.

20

25

Азидо-4-метокси-4-оксобутан-2-сульфонова кислота

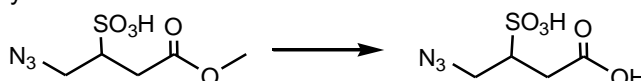


До розчину метил-3-(ацетилтіо)-4-азидобутаноату (4,00 г, 18,43 ммоль) у 75 мл оцтової кислоти вносили 25 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Суміш перемішували протягом ночі, випаровували і знову випаровували з сумішшю  $\text{EtOH}/\text{толуол}$  і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  від 100:800:1 до 100:500:1), отримуючи 3,85 г (93%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 3.78 (dd, 1H,  $J = 5.0, 12.7$  Hz), 3.62 (s, 3H), 3.44 (dd, 1H,  $J = 7.5, 12.7$  Hz), 3.33 (m, 1H), 2.84 (dd, 1H,  $J = 5.6, 16.5$  Hz), 2.57 (dd, 1H,  $J = 7.5, 16.5$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 173.37, 57.31, 52.54, 52.49, 34.51. ESI MS: m/z- 221.7 (M+H).

30

35

4-Азидо-3-сульфобутанова кислота

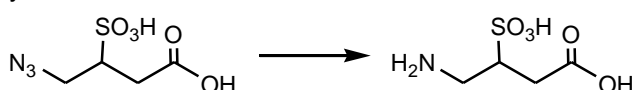


До розчину азидо-4-метокси-4-оксобутан-2-сульфонової кислоти (3,80 г, 17,04 ммоль) в 150 мл 1,0 М  $\text{HCl}$  додавали 8,0 мл  $\text{HAc}$ . Суміш кип'ятили при  $120^\circ\text{C}$  протягом ночі, випаровували і знову випаровували з водою,  $\text{EtOH}$  і сумішшю  $\text{EtOH}/\text{толуол}$ , відповідно, і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  від 100:500:1 до 100:400:1), отримуючи 3,02 г (85%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 3.77 (dd, 1H,  $J = 5.1, 12.8$  Hz), 3.45 (dd, 1H,  $J = 7.0, 12.8$  Hz), 3.31 (m, 1H), 2.86 (dd, 1H,  $J = 4.7, 16.7$  Hz), 2.51 (dd, 1H,  $J = 8.4, 16.7$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 173.98, 67.50, 59.78, 27.82. ESI MS: m/z- 207.7 (M-H).

40

45

4-Аміно-3-сульфобутанова кислота

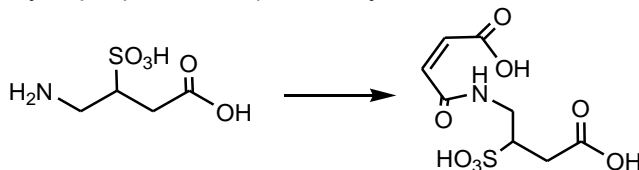


У гідрогенізаційну посудину на 500 мл вносили 4-азидо-3-сульфобутанову кислоту (3,00 г, 14,35 ммоль), 150 мл метанолу і 0,32 г  $\text{Pd/C}$  (10%  $\text{Pd}$ , 50% у вологому стані). Після того, як повітря було відкачане, подавали  $\text{H}_2$  при 30 psi і суміші струшували протягом ночі, фільтрували крізь целіт, випаровували і знову випаровували з безводним  $\text{EtOH}$ , отримуючи 2,50 г (95%) 4-

50

аміно-3-сульфобутанової кислоти.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 3.24 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.90 (dd, 1H, J = 2.6, 16.5 Hz), 2.33 (dd, 1H, J = 10.1, 16.5 Hz). ESI MS: m/z- 181.60 (M-H). Отримана сполука була нестійкою, і її використовували безпосередньо без подальшого очищення.

(Z)-4-(3-Карбокси-2-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнова кислота

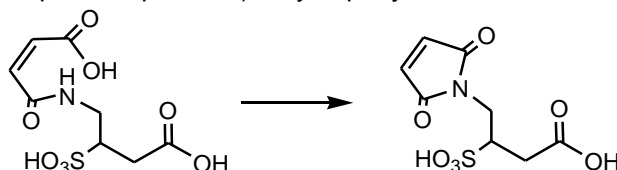


5

До розчину 4-аміно-3-сульфобутанової кислоти (~2,50 г, 13,66 ммоль) в 100 мл DMA додавали малеїновий ангідрид і перемішували суміш протягом ночі, очищали на колонці C-18 (2×30 см), елюючи 1% HAc у воді, і піддавали кристалізації в суміші MeOH/ацетон/толуол, отримуючи 3,34 г (83%) (Z)-4-(3-карбокси-2-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнової кислоти.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 6.33 (d, 1H, J = 12.6 Hz), 6.10 (d, 1H, J = 12.6 Hz), 3.64 (dd, 1H, J = 5.8, 14.0 Hz), 3.54 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.78 (dd, 1H, J = 4.9, 16.8 Hz), 2.39 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.52, 168.68, 167.98, 135.59, 127.79, 57.31, 40.56, 34.52. ESI MS: m/z- 279.7 (M-H).

10

4-(2,5-Диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-3-сульфобутанова кислота



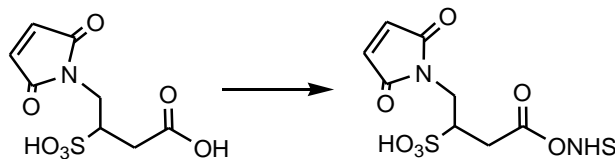
15

(Z)-4-(3-Карбокси-2-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнову кислоту (450 міліграм, 1,60 ммоль) нагрівали в суміші з 10 мл безводного DMA і 50 мл безводного толуолу. Після того, як температура досягла 80 °C, додавали HMDS (гексаметилдисилазан) (1,80 мл, 8,63 ммоль) і  $\text{ZnCl}_2$  (3,2 мл, 1,0 M в діетиловому ефірі). Суміш продовжували нагрівати до 115~125 °C і збирали толуол пасткою Dean-Stark. Реакційну суміш кип'ятили при 120 °C протягом 6 год. За цей час додавали 2×20 мл безводного толуолу, щоб підтримати об'єм суміші близько 8~10 мл. Потім суміш охолоджували, додавали 1 мл суміші конц.  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:10), випаровували і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  1:5:0,01), отримуючи 315 міліграм (75%) вказаного в заголовку продукту.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 6.96 (s, 2H), 4.04 (dd, 1H, J = 4.3, 13.8 Hz), 3.47 (m, 1H), 3.23 (dd, 1H, J = 7.4, 14.7 Hz), 2.99 (dd, 1H, J = 3.3, 16.8 Hz), 2.35 (dd, 1H, J = 8.1, 16.9 Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.58, 172.18, 135.54, 54.61, 40.24, 32.43. ESI MS: m/z- 261.70 (M-H).

20

25

1-(2,5-Диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-4-(2,5-диоксопіролідин-1-ілокси)-4-оксобутан-2-сульфонова кислота

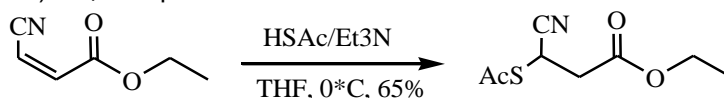


30

4-(2,5-Диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-3-сульфобутанову кислоту (110 міліграм, 0,418 ммоль), EDC (240 міліграм, 1,25 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (58 міліграм, 0,504 ммоль) перемішували в 10 мл DMA протягом ночі, випаровували і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  від 100:900:1 до 100:600:1), отримуючи 112 міліграми (75%) вказаного в заголовку продукту.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMF-d}_7$ ): 6.93 (s, 2H), 4.06 (dd, 1H, J = 4.8, 13.1 Hz), 3.80 (dd, 1H, J = 10.7, 13.9 Hz), 3.35 (dd, 1H, J = 3.3, 17.8 Hz), 3.25 (m, 1H), 3.10 (dd, 1H, J = 2.2, 16.4 Hz), 2.87 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 172.27, 170.88, 169.29, 135.55, 55.28, 40.22, 32.69, 26.66. ESI MS: m/z- 261.70 (M-H).

35

Етил-3-(ацетилтіо)-3-ціанопропаноат



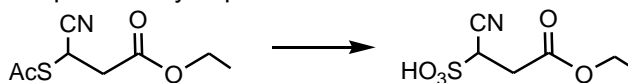
40

(Z)-етил-3-ціаноакрилат (5,01 г, 40,00 ммоль) у 80 мл THF при 520 °C вносили до розчину тіооцтової кислоти (5,0 мл, 70,15 ммоль) і DIPEA (16,0 мл, 92,03 ммоль) в 20 мл THF протягом 30 хв. Реакцію підтримували при 520 °C протягом 4 год., а потім за кімнатної температури протягом ночі. Суміш концентрували, розбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , промивали насиченими  $\text{NaHCO}_3$ , сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фільтрували, випаровували і очищали методом хроматографії в  $\text{SiO}_2$  (суміш



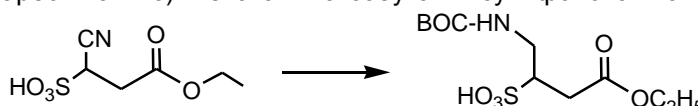
EtAC/гексан 1:4), отримуючи 5,22 г (65%) вказаної в заголовку сполуки.  $R_f = 0,25$  (EtAC/гексан 1:4).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.44 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H,  $J = 7.1, 14.3$  Hz), 3.38 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.19 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 194.12, 173.21, 119.82, 61.35, 33.52, 30.08, 14.62. MS:  $m/z$  225.9 (M+Na),  $m/z$  201.7 (M-H).

5 Ціано-3-етокси-3-оксопропан-1-сульфонова кислота



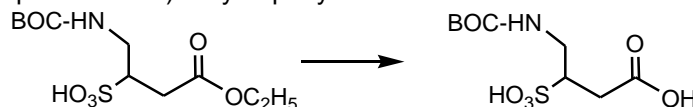
До розчину етил-3-(ацетилтіо)-3-ціанопропанату (2,00 г, 9,95 ммоль) у оцтовій кислоті (40 мл) додавали  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12 мл, 30%). Суміш перемішували протягом ночі, випаровували і очищали методом хроматографії в силікагелі (елюювали сумішшю метанол/дихлорметан/оцтова кислота від 1:8:0,01 до 1:5:0,01), отримуючи 1,72 г (84%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO): 4.63 (m, 1H), 4.12 (dd, 2H,  $J = 7.1, 14.3$  Hz), 3.27 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 1.28 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.15, 113.85, 61.38, 48.32, 26.33, 14.15. MS:  $m/z$  205.7 (M-H).

10 1-(трет-бутоксикарбоніламіно)-4-етокси-4-оксобутан-2-сульфонова кислота



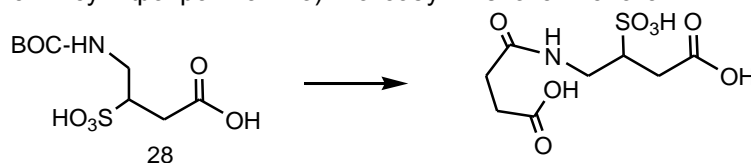
15 У гідрогенізаційну посудину вносили ціано-3-етокси-3-оксопропан-1-сульфову кислоту (2,50 г, 12,06 ммоль), етанол (80 мл), свіжий фільтрований нікель Raney (0,40 г) і BOC-ангідрид (3,30 г, 15,12 ммоль). Після того, як повітря з посудини було відкачане під вакуумом, в посудину подавали водень при 20 psi. Посудину струшували протягом ночі, фільтрували крізь целіт, випаровували і очищали методом хроматографії в силікагелі (елюювали сумішшю метанол/дихлорметан/оцтова кислота 1:6:0,01), отримуючи 3,18 г (85%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO): 6.82 (s, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H,  $J = 7.1, 14.3$  Hz), 3.53 (dd, 1H,  $J = 4.2, 13.4$  Hz), 3.36 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.22 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.35, 155.72, 80.44, 62.05, 52.55, 41.61, 34.50, 28.85, 14.52. MS:  $m/z$  309.8 (M-H).

20 4-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-сульфобутанова кислота



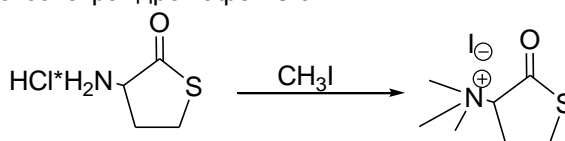
25 До розчину 1-(трет-бутоксикарбоніламіно)-4-етокси-4-оксобутан-2-сульфонові кислоти (402 міліграми, 1,29 ммоль) в суміші THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:2, 60 мл) додавали гідроксид літію моногідрат (2,0 г, 47,6 ммоль). Суміш перемішували в атмосфері Ar протягом ночі, концентрували і очищали на колонці C-18 (2×30 см), елюючи градієнтом від 100% води до 10% метанолу у воді, отримуючи 328 міліграм (90%) вказаної в заголовку сполуки.  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO): 6.78 (s, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.57 (dd, 1H,  $J = 4.2, 13.4$  Hz), 3.41 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 1.39 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 174.21, 155.82, 79.85, 59.95, 42.06, 32.52, 28.88, 14.55. ESI MS: 281.8 (M-H).

30 (Z)-4-(3-Карбокси-2-сульфопропіламіно)-4-оксобут-2-єнова кислота



35 4-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-сульфобутанову кислоту (321 міліграм, 1,13 ммоль) перемішували в суміші конц. HCl/діоксан (1:4, 15 мл) протягом 30 хв., випаровували і знову випаровували в суміші EtOH/толуол (1:1, 4 20 мл) насухо. До висушеного матеріалу додавали малеїновий ангідрид (121 міліграм, 1,23 ммоль) і DMA (20 мл) і перемішували суміш протягом ночі, випаровували і пропускали через колонку C-18, елюючи водою, і піддавали кристалізації в суміші EtOH/гексан, отримуючи 263 міліграми (83%) вказаної в заголовку сполуки. ESI MS: 279.8 (M-H). Дані ЯМР такі ж, як при отриманні через 4-азидо-3-сульфобутанову кислоту.

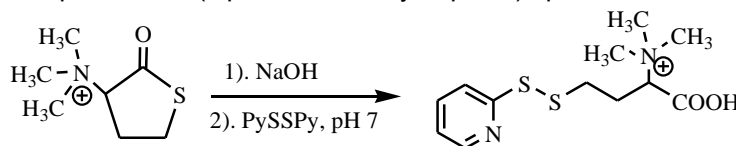
40 N,N,N-Триметил-2-оксотетрагідротіофен-3-аміній



45 3-Амінодігідротіофен-2(3H)-она гідрохлорид (6,00 г, 39,1 ммоль), бікарбонат натрію (3,28 г, 39,1 ммоль) і йодометан (13 мл, 209 ммоль) перемішували в безводному метанолі (100 мл)

протягом ночі, фільтрували крізь целіт, випаровували, очищали на колонці з  $\text{SiO}_2$  (елюювали сумішшю  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HAc}$  1:5:0,01) і піддавали кристалізації в суміші  $\text{EtOH}/\text{гексан}$ , отримуючи 5,25 г (84%) вказаного в заголовку продукту. Т.пл. 228-231 °C.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 4.27 (m, 1H), 3.25 (s, 9H), 2.56-2.47 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.26 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 168.97, 75.06, 53.25, 30.85, 16.46. ESI MS:  $m/z$  160.0 ( $\text{M}^+$ ).

1-Карбокси-N,N,N-триметил-3-(піридин-2-ілдисульфаніл) пропан-1-аминий



N,N,N-Триметил-2-оксотетрагідротіофен-3-амінію ацетат (2 г, 9,13 ммоль) перемішували в 75 мл 1 М NaOH (3 г NaOH в 75 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ) протягом 45 хв., нейтралізували 4 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до pH 7,4, концентрували і вносили до розчину 1,2-ди(піридин-2-іл) дисульфану (11 г, 49,9 ммоль) в 200 мл MeOH. Суміш перемішували протягом ночі і екстрагували EtAc. Водний розчин випаровували, суспендували в MeOH, фільтрували сіль, випаровували і очищали на колонці з C-18 (2 см × 30 см), елюючи сумішшю вода/метанол (від 100% води до 20% метанолу у воді), отримуючи 2,6 г (75%) вказаного в заголовку продукту. ESI MS:  $m/z$  309.1 ( $\text{M}+\text{Na}_5\text{H}$ ).

1. Модифікування антитіл за допомогою сульфолінкера

Антитіло huC242 піддавали модифікації за допомогою сульфолінкера при 8 міліграмі/мл антитіл, тобто 15-кратному молярному надлишку сульфолінкера (початковий розчин ~30 мМ в DMA). Реакцію проводили в 100 мМ NaPi-буфері pH 8,0 з DMA (5% про.) протягом 15, 30, 120 і 200 хв. при 25 °C. Модифіковані huC242 очищали на колонці з G25 за допомогою 50 мМ NaPi, 50 мМ NaCl і 2 мМ EDTA, pH6,5, щоб видалити надлишок сульфо-лінкера.

2. Вимірювання вивільненого Spy-NO<sub>2</sub> і концентрації модифікованих антитіл huC242

Визначення і спектральні вимірювання проводили в 100 мМ NaPi pH7,5 за кімнатної температури. Молярну частку вивільненого Spy-NO<sub>2</sub> на 1 моль антитіл huC242 розраховували за вимірюванням  $A_{280}$  в зразку і подальшому підвищенню  $A_{394}$  в зразку після додавання DTT (50 мкл 1 М DTT на 1 мл зразка). Концентрацію вивільненого DTT 2-меркаптопіридину розраховували, використовуючи значення  $\epsilon_{394}$  у  $14\,205\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Потім можна розрахувати концентрацію антитіл, використовуючи значення  $\epsilon_{280}$  у  $217\,560\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  за вирахуванням внеску поглинання Spy-NO<sub>2</sub> при 280 нм ( $A_{394}$  після DTT ×  $3344/14205$ ) із загальної величини  $A_{280}$ , виміряної перед додаванням DTT. Тепер можна розрахувати молярне відношення Spy-NO<sub>2</sub>:Ab. Концентрацію huC242 розраховували, використовуючи значення молекулярної ваги в 147 000 г/моль.

3. Реакція кон'югації

Модифіковане антитіло huC242 піддавали реакції при 1,7-разовому молярному надлишку DM4 (виходячи з концентрації SH в препараті DM4) над Spy-NO<sub>2</sub>. Реакцію проводили при 2,5 міліграм/мл антитіл в 50 мМ NaPi, 50 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, pH6,5, і DMA (5% про.). Після додавання DM4 реакцію інкубували при 25 °C протягом ~20 годин. Кінцевий кон'югат очищали на колонці G25 за допомогою 10 мМ гістидину, 130 мМ гліцину, 5% сахарози, pH5,5, щоб видалити надлишок препарату DM4.

4. Розрахунок концентрацій huC242 і DM4

І huC242, і DM4 поглинають при двох довжинах хвиль, які використовуються для вимірювання кожного компоненту окремо, тобто 280 і 252 нм. Коефіцієнт екстинкції при 280 нм для huC242 дорівнює  $217\,560$ , а для DM4 –  $5\,180\text{ M}^{-1}$ . Відношення поглинання при 252 нм/280 нм для huC242 і DM4 складає 0,368 і 5,05, відповідно. Концентрації розраховували за наступними рівняннями:

$$C_D = \frac{A_{252} - 0,368 A_{280}}{24692,4} \quad C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5180 C_D}{217560}$$

Результати

Тривалість модифікації	L/A	D/A	Частка мономера	Вільний препарат (%)
15 хв.	5,0	4,1	96,7%	н/о*
30 хв.	6,1	5,4	96,2%	<1%
120 хв.	6,6	6,8	95,7%	<1%
200 хв.	6,6	6,3	95,9%	<1%

Титрування лінкера в C242-сульфо-DM4

Надлишок лінкера	L:A	Надлишок DM4	D:A	Ab (мг/мл)	DM4 (мкг/мл)	Мономер (%)	Вільний препарат (%)
5	2,4	1,7	1,9	0,83	8,2	95	0
10	4,1	1,7	3,3	0,83	14,4	94	0
15	5,6	1,7	4,6	0,82	20,0	93	0
20	7,3	1,7	6,0	0,82	25,8	91	0
25	9,1	1,3	6,6	0,79	27,7	92	0,6
30	10,4	1,3	7,6	0,68	27,5	94	1,1
35	12,2	1,3	8,2	0,67	26,7	95	1,6

#### Методика кон'югації

Модифікації проводили при pH 8,0 в буфері А з 5% DMA протягом 90 хв. за кімнатної температури, а концентрація антитіл складала 7 мг/мл. Модифіковані антитіла очищали на колонці з NAP, використовуючи буфер А pH 6,5. Кон'югування проводили в буфері А pH 6,5 з 5-10% DMA за кімнатної температури протягом ночі. Відношення препарат:лінкер складало від 1,3 до 1,7 залежно від загальної кількості препарату.

#### Приклад 2. Синтез кон'югатів

Зшиваючий реагент SPP або SSNPP розчиняли в етанолі при концентрації приблизно 10 мМ. Антитіло діалізували в буфері А (50 мМ  $\text{KPi}$ , 50 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, pH 6,5). Для реакції із зшиваючим реагентом брали антитіло при 8 мг/мл і додавали 7 еквівалентів лінкера з перемішуванням у присутності 5% об. етанолу. Реакція протікала за кімнатної температури протягом 90 хв. Лінкер, який не прореагував, видаляли від антитіл при гель-фільтрації крізь Sephadex G25, використовуючи колонку Sephadex G25, урівноважену буфером А при pH 6,5 або 150 мМ калій-фосфатним буфером pH 7,4, який містить 100 мМ NaCl, як вказано. Для SPP-лінкера ступінь модифікації оцінювали за вивільненням піридин-2-тіону за допомогою 50 мМ DTT і вимірюванням поглинання при 343 нм, як описано нижче ( $\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для вільного піридин-2-тіону). Для SSNPP ступінь модифікації оцінювали безпосередньо за вимірюванням поглинання при 325 нм ( $\epsilon_{325} = 10\,964 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для 4-нітропіридил-2-дитіогрупи, сполученої з антитілом). Для реакції кон'югації препарат, який містить тіол (DM1 або DC4) розчиняли в DMA (N,N-диметилацетамід) при концентрації приблизно 10 мМ. Препарат (як вказано, 0,8–1,7-кратний молярний надлишок відносно числа молекул лінкера на антитіло) додавали поволі з перемішуванням до антитіла, яке брали в концентрації 2,5 мг/мл в буфері А (pH 6,5 або pH 7,4) з кінцевою концентрацією 3% об. DMA. Реакція протікала за кімнатної температури протягом вказаного часу. Антитіла кон'юговані з препаратом очищали на колонці Sephadex G25, урівноваженій буфером В (PBS, pH 6,5). Для DM1 ступінь кон'югації з антитілом оцінювали за вимірюванням  $A_{252}$  і  $A_{280}$  кон'югата, як описано нижче. Аналогічний підхід використовували для DC4 (див. нижче).

Вимірювання вивільненого піридин-2-тіону і концентрації модифікованих антитіл SPP (Ab)

Молярну частку вивільненого піридин-2-тіону на 1 моль антитіл розраховували за вимірюванням  $A_{280}$  в зразку і подальшим підвищенням  $A_{343}$  в зразку після додавання DTT (50 мкл 1 М DTT на 1 мл зразка). Концентрацію вивільненого DTT піридин-2-тіону розраховували, використовуючи значення  $\epsilon_{343}$  у  $8\,080 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Потім можна розрахувати концентрацію антитіл, використовуючи значення  $\epsilon_{280}$  у  $194\,712 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  вираховуючи внесок поглинання піридин-2-тіону при 280 нм ( $A_{343}$  після DTT  $\times 5100/8080$ ) із загальної величини  $A_{280}$ , виміряної перед додаванням DTT. Тепер можна розрахувати молярне відношення піридин-2-тіон:Ab. Концентрацію Ab в міліграми/мл (г/л) розраховували, використовуючи значення молекулярної ваги в 147 000 г/моль.

Вимірювання зв'язаних з антитілами 5-нітропіридил-2-дитіогруп і концентрації модифікованих антитіл SSNPP (Ab)

Молярну частку зв'язаних 4-нітропіридил-2-дитіогруп на 1 моль антитіл розраховували вимірюванням  $A_{280}$  і  $A_{325}$  в зразку без обробки DTT. Концентрацію зв'язаних з антитілами 4-нітропіридил-2-дитіогруп розраховували, використовуючи значення  $\epsilon_{325}$  у  $10\,964 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Потім можна розрахувати концентрацію антитіл, використовуючи значення  $\epsilon_{280}$  у  $194\,712 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  вираховуючи внесок поглинання 5-нітропіридил-2-дитіогруп при 280 нм ( $A_{325} \times 3344/10964$ ) із загальної величини  $A_{280}$ . Тепер можна розрахувати молярне відношення 4-нітропіридил-2-дитіогрупи:Ab. Концентрацію Ab в міліграми/мл (г/л) розраховували, використовуючи значення молекулярної ваги в 147 000 г/моль.

Розрахунок концентрацій компонентів Ab і DM1 в Ab-DM1

І Ab, і DM1 поглинають при двох довжинах хвиль, які використовуються для вимірювання

кожного компоненту окремо, тобто 280 і 252 нм. Ці компоненти визначаються з наступних виразів алгебри, які відображають внесок кожного компоненту при кожній довжині хвилі ( $C_{Ab}$  – молярна концентрація Ab, а  $C_D$  – молярна концентрація DM1):

$$1) \text{ загальна величина } A_{280} = 194712C_{Ab} + 5700C_D$$

$$2) \text{ загальна величина } A_{252} = (194712 \cdot 0,37)C_{Ab} + (4,7 \cdot 5700)C_D.$$

За кожним рівнянням знаходимо рішення для  $C_{Ab}$ :

$$1a) \quad C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5700C_D}{194712},$$

$$2a) \quad C_{Ab} = \frac{A_{252} - 26790C_D}{72043},$$

прирівнюємо їх (рівняння 1a = рівняння 2a) і знаходимо рішення для  $C_D$ :

$$C_D = \frac{A_{252} - 0,37A_{280}}{24681}.$$

Після обчислення  $C_D$  це значення використовується для знаходження  $C_{Ab}$  відповідно до вищенаведеного рівняння 1a (або 2a). Тепер можна розрахувати відношення DM1:Ab. Концентрацію Ab в мг/мл(г/л) розраховували, використовуючи значення молекулярної ваги в 147 000 г/моль, а концентрацію DM1 розраховували, використовуючи значення молекулярної ваги в 736,5 г/моль (зв'язаний DM1).

Ефективність дисульфідного обміну підвищується при використанні SSNPP

Як видно з табл. 1, ефективність кон'югації підвищується при реакціях з використанням SSNPP як зшиваючого реагенту в порівнянні з використанням для цього SPP. Ефективність у відсотках розраховували діленням величини DM1:антитіло на відношення лінкер:антитіло і множенням на 100. Кон'югація антитіл N901 за допомогою SSNPP давала ефективність зшивання в 93% і при pH 6,5, і при pH 7,4. Ефективність кон'югації N901 за допомогою SPP в цих дослідках складала 70% при pH 6,5 і 77% при pH 7,4. Підвищення ефективності при використанні SSNPP свідчить, що намічене співвідношення DM1:антитіло може бути досягнуте за допомогою модифікованих антитіл з меншим числом молекул лінкера. Насправді, близьке співвідношення препарат:антитіло (4,3) у кінцевого кон'югата виходило при використанні препарату антитіл, який містить 4,2 (5-нітропіридил-2-дитіо) груп на 1 антитіло, введених за допомогою SSNPP, в порівнянні з антитілом, що містить 5,6 піридил-2-дитіогруп, введених за допомогою SPP (табл. 2). Таким чином, кількість препарату, необхідна для отримання порівнянних результатів кон'югації, на 25% менше у модифікованого антитіла SSNPP, ніж у модифікованого антитіла SPP за цих умов. Додаткова потенційна вигода від підвищення ефективності з SSNPP полягає в тому, що в результаті реакції кон'югації можна використовувати менший молярний надлишок DM1. Порівняння співвідношення DM1:антитіло після кон'югації з використанням ряду еквівалентів препарату в результаті реакції (0,8–1,7-кратний надлишок) показує, що 1,1-кратний молярний надлишок достатній для досягнення 100% ефективності кон'югації за допомогою зшиваючого реагенту SSNPP (Фіг. 7). Порівняння динаміки у часі реакції DM1 з антитілом, яке було модифіковане за допомогою SSNPP або SPP, представлено, наприклад, на Фіг. 8. В кожному випадку модифіковане антитіло обробляли 1,1-кратним молярним надлишком DM1 на 1 моль введеного лінкера. Реакція з модифікованим антитілом SSNPP протікає значно швидше, ніж з модифікованим антитілом SPP (Фіг. 8). Навіть 1,7-кратний молярний надлишок недостатній для досягнення аналогічної ефективності за допомогою SPP. Можливість використовувати 1) менший молярний надлишок DM1 і 2) менше число молекул лінкера на антитіло дозволяє зменшити кількість препарату, необхідну для досягнення наміченого співвідношення DM1:антитіло, майже на 50% при використанні SSNPP як зшиваючого реагенту замість SPP.

Підвищення ефективності кон'югації при використанні SSNPP-лінкера здійснюється без погіршення мономерної природи кон'югата і кількості некон'югованого (вільного) препарату, зв'язаного з кон'югатом антитіл. Для визначення кількості мономерів, димерів, тримерів або ще більш високомолекулярних агрегатів застосовується SEC-аналіз. Типові результати більш ніж 90% вмісту мономера були отримані з кожним лінкером, як видно з табл. 1. У зразках кон'югатів вимірювали вміст некон'югованого препарату методом зворотньофазової HPLC. Вміст вільного препарату у кожній реакції складав менше 2%. Крім того, можливим є скорочення тривалості реакції кон'югації за допомогою SSNPP в порівнянні з SPP (U.S. Patent No. 6,913,748), що може зменшити втрати деяких антитіл, чутливих до тривалої дії органічного розчинника, необхідного в результаті реакції кон'югації. Скорочення тривалості реакції також повинне зменшити втрати препарату внаслідок димеризації DM1, яка є конкуруючою побічною реакцією під час кон'югації.

Як наслідок, підвищення виходу і зменшення побічних реакцій повинне ще більше сприяти зниженню потреби в DM1.

Підвищення швидкості і ефективності кон'югації при використанні SSNPP також спостерігалось при кон'югації іншого препарату з антитілом, що свідчить про можливість широкого застосування цього нового зшиваючого реагенту. Порівняння ефективності кон'югації за допомогою SSNPP і SPP при кон'югації антитіла N901 з ДНК-алкілюючим препаратом DC4, аналогом CC-1065, представлено, наприклад, в табл. 3. Через 2 години реакція з використанням зшиваючого реагенту SSNPP завершилася, тоді як реакція з використанням реагенту SPP пройшла тільки на 73% до 2 годин, і спостерігалось значне включення препарату після 2 годин (на 91% через 18 годин). Тільки набагато більша тривалість реакції може привести до 100% результату.

Приклад 3. Оцінка цитотоксичності *in vitro* кон'югатів мایتансиноїдів з антитілами з тіоефірними (нерозщеплюваними) і дисульфідними лінкерами, які містять сульфогрупу

Цитотоксичні ефекти кон'югатів антитіло-майтансиноїд з тіоефірними і дисульфідними лінкерами, які містять сульфогрупу, зазвичай оцінювали методом визначення життєздатності клітин за допомогою WST-8 після 4-5-денної безперервної інкубації ракових клітин з кон'югатами. Ракові клітини, які експресували антиген (~1000-5000 клітин на комірку) інкубували в 96-коміркових планшетах в нормальному культуральному середовищі, яке містить телячу сироватку, за різних концентрацій кон'югатів антитіло-майтансиноїд протягом, приблизно, 5 днів. Потім додавали реагент WST-8 і через ~2-5 год. вимірювали поглинання при 450 нм. Складали графік показника виживаності від концентрації кон'югата для визначення величини IC<sub>50</sub> (концентрації, що викликає загибель 50% клітин).

На Фіг. 60 і 61 представлено посилення цитотоксичності кон'югатів анти-CanAg (huC242) - мایتансиноїд з зв'язаним дисульфідним зв'язком лінкером (huC242-сульфо-SPDB-DM4), який містить сульфогрупу і який несе від 6,0 до 7,6 молекул мایتансиноїду на 1 антитіло, порівняно з кон'югатом з 3,3 мایتансиноїдами на 1 антитіло, на CanAg-позитивні клітини COLO205 і COLO205-MDR. Сильна активність кон'югатів з високим вмістом мایتансиноїдів позначає, що нанесення на антитіло аж до 8 молекул мایتансиноїду не впливає на зв'язування кон'югата з клітинами мішені – COLO205.

На Фіг. 62 представлена цитотоксична дія кон'югатів Ab проти CanAg-майтансиноїд з аналогічним вмістом мایتансиноїду на позитивних за антигеном CanAg клітини COLO205-MDR. Наявність сульфогрупи в дисульфідному лінкері значно підвищує дію кон'югатів на ці клітини з множинною лікарською стійкістю. Посилення активності сульфо-зв'язаних кон'югатів є новим результатом і потенційно дуже перспективним для терапевтичного застосування.

На Фіг. 63 представлена цитотоксична дія кон'югатів Ab проти ЕрCAM-майтансиноїд з аналогічним вмістом мایتансиноїду на позитивних за антигеном ЕрCAM клітини COLO205-MDR. Наявність сульфогрупи в дисульфідному лінкері значно підвищує дію кон'югатів на ці клітини з множинною лікарською стійкістю. Посилення активності сульфо-зв'язаних кон'югатів є новим результатом і потенційно дуже перспективним для терапевтичного застосування.

На Фіг. 64 представлена цитотоксична дія кон'югатів Ab проти ЕрCAM-майтансиноїд з аналогічним вмістом мایتансиноїду на позитивних за антигеном ЕрCAM клітини HCT. Наявність сульфогрупи в дисульфідному лінкері значно підвищує дію кон'югатів на ці клітини з множинною лікарською стійкістю. Посилення активності сульфо-зв'язаних кон'югатів є новим результатом і потенційно дуже перспективним для терапевтичного застосування.

На Фіг. 65 представлена цитотоксична дія кон'югатів Ab проти ЕрCAM-майтансиноїд з аналогічним вмістом мایتансиноїду на позитивних за антигеном ЕрCAM клітини COLO205-MDR. Наявність сульфогрупи в тіоефірному лінкері значно підвищує дію кон'югатів на ці клітини з множинною лікарською стійкістю. Посилення активності сульфо-зв'язаних кон'югатів є новим результатом і потенційно дуже перспективним для терапевтичного застосування.

Приклад 4. Порівняння протипухлинної дії *in vivo* кон'югатів анти-ЕрCAM-майтансиноїд, B38.1-SPDB-DM4 і B38.1-сульфо-SPDB-DM4, на ксенотрансплантати раку товстої кишки, COLO205 і COLO205-MDR

Протипухлинний ефект кон'югатів B38.1-SPDB-DM4 і B38.1-сульфо-SPDB-DM4 оцінювали на моделі ксенотрансплантатів карциноми товстої кишки людини – клітинах COLO205 і COLO205-MDR, які піддавались інженерії для суперекспресії Р-глікопротеїду. Клітини вводили підшкірно в зону під правим плечем мишей SCID. Коли об'єм пухлини досягав розміру приблизно 200 мм<sup>3</sup>, мишей рандомізували за об'ємом пухлин і розбивали на 3 групи. Кожна група отримувала внутрішньовенно єдиний болюс B38.1-SPDB-DM4 (10 мг білка кон'югата/кг), B38.1-сульфо-SPDB-DM4 (10 мг білка кон'югата/кг) або фізіологічного розчину з фосфатним буфером (контроль на носій). Ріст пухлин відстежували за вимірюванням розміру пухлини 2 рази на

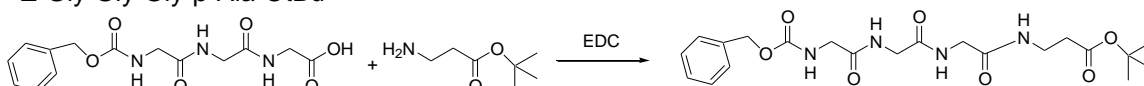
тиждень. Розмір пухлини розраховували за формулою: довжина × ширина × висота × 1/2.

Зміни об'єму індивідуальних пухлин COLO205-MDR представлені на Фіг. 66. Обробка кожним кон'югатом приводила до значного уповільнення росту пухлин. B38.1-сульфо-SPDB-DM4 виявився ефективнішим, ніж B38.1-SPDB-DM4 на цій моделі ксенотрансплантатів раку товстої кишки людини.

Зміни об'єму індивідуальних пухлин COLO205 представлені на Фіг. 67. Обробка кожним кон'югатом приводила до значного уповільнення росту пухлин. У двох з 6 тварин, які отримували B38.1-сульфо-SPDB-DM4, відбувалася повна регресія пухлин. Таким чином, на цій моделі B38.1-сульфо-SPDB-DM4 виявився ефективнішим, ніж B38.1-SPDB-DM4.

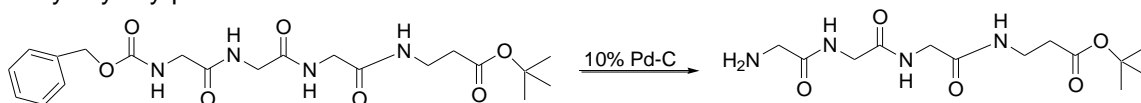
Приклад 5. Синтез попередників заряджених лінкерів (CX1-1)

Z-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu



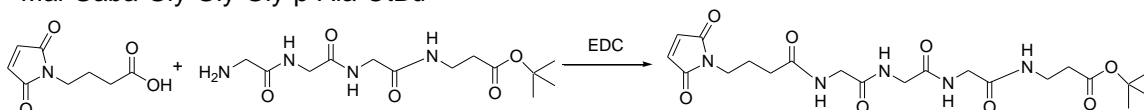
Робили навішування 1,3 г (4,0 ммоль) Z-Gly-Gly-Gly-OH, 0,583 г (4,0 ммоль) трет-бутил-3-амінопропіонату, 0,651 г (4,25 ммоль) гідроксибензотриазолу і 0,81 г (4,23 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімиду гідрохлориду в колбу на 50 мл, а потім розчиняли в 20 мл диметилформаміду на магнітній мішалці в атмосфері азоту. Через 3 години реакційну суміш очищали порціями по 5 мл методом зворотньофазової HPLC на колонці C18 5,0 см × 25 см. Колонку елюювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% ацетонітрилу, при 100 мл/хв. протягом 10 хв., а потім протягом 15 хв. лінійним градієнтом від 5% ацетонітрилу до 90% ацетонітрилу. Фракції (час утримання = 19 хв.), які містять продукт, об'єднували і видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 1,35 г (75%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.16 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.25-7.4 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 3.74 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.67 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.25 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 170.45, 169.61, 169.00, 168.63, 156.49, 136.94, 128.30, 127.76, 127.69, 79.89, 65.51, 43.56, 42.10, 41.90, 34.89, 34.78, 27.70. HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 473.2012, факт. 473.1995.

H-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu



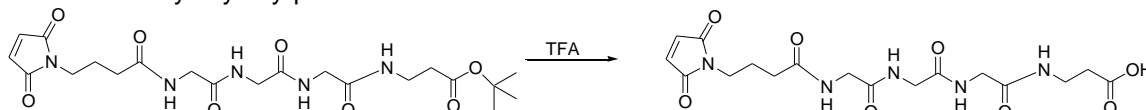
Розчиняли 1,3 г (2,89 ммоль) Z-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu в 80 мл суміші метанол:деіонізована вода 95:5 в качалочній колбі Парра на 250 мл, в яку додавали 0,12 г 10% паладію на вугліці. Колбу струшували в атмосфері водню (42 psi) протягом 7 годин. Суміш піддавали вакуум-фільтрації крізь особливий целітовий фільтр, а фільтрат концентрували на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 0,88 г (96%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.12 (t, J = 1.6 Hz, 2H), 8.08 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.64 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.28 (bs, 2H), 3.24 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.13 (s, 2H), 2.35 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 173.38, 170.46, 169.18, 168.70, 79.89, 44.65, 41.95, 34.88, 34.78, 27.71. HRMS: (M+H<sup>+</sup>) теор. 317.1825, факт. 317.1801.

Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu



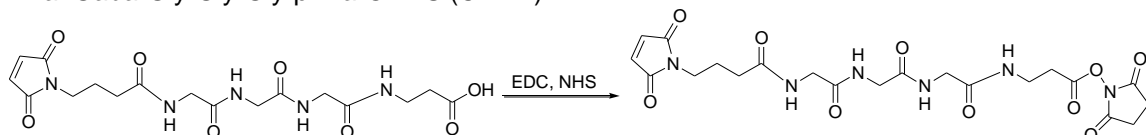
Розчиняли 513 мг (2,8 ммоль) 4-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-бутанової кислоти, 800 міліграм (2,8 ммоль) трет-бутил-3-(2-(2-(2-аміноацетамідо)-ацетамідо)-ацетамідо)пропаноату і 583 міліграми (3,0 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімиду гідрохлориду в 12 мл диметилформаміду і перемішували протягом 3 годин. Реакційну суміш очищали 4 рівними порціями методом зворотньофазової HPLC на колонці C18 5,0 см × 25 см. Колонку елюювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% ацетонітрилу, при 100 мл/хв. протягом 10 хв., а потім протягом 13 хв. лінійним градієнтом від 5% ацетонітрилу до 33% ацетонітрилу. Фракції (час утримання = 21 хв.), які містять продукт, об'єднували і видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 832 мг (62%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.10-8.16 (m, 2H), 8.07 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.0-7.15 (m, 1H), 3.747 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 3.64 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 6.8, 2H), 3.1-3.33 (m, 1H), 3.19-3.26 (m, 2H), 2.348 (t, J = 6.8, 2H), 2.132 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.67-1.76 (m, 2H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 171.80, 170.98, 170.39, 169.48, 168.96, 168.56, 134.37, 79.83, 42.05, 41.83, 37.38, 34.82, 34.71, 32.26, 27.83, 23.95. HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 504.2070, факт. 504.2046.

## Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OH

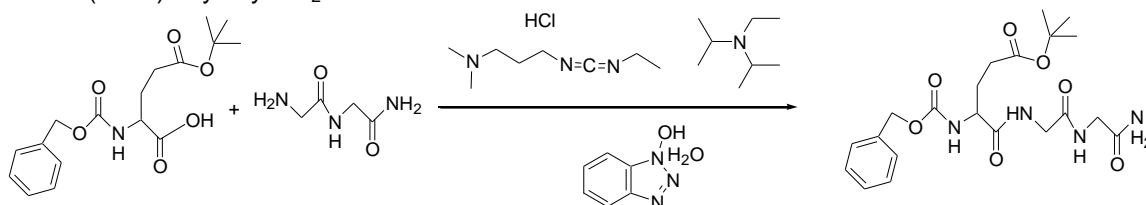


Розчиняли 820 мг (1,7 ммоль) Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu в 9,0 мл суміші трифтороцтова кислота:деіонізована вода 95:5 і перемішували на магнітній мішалці протягом 3 годин. Видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 730 мг (100%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 12.1 (bs, 1H), 8.05-8.20 (m, 3H), 7.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.71 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.65 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.26 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.14 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 1.67-1.77 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 172.70, 171.83, 171.01, 169.50, 168.99, 168.51, 134.38, 42.07, 41.84, 36.75, 34.70, 33.69, 32.28, 23.97. HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 448.1444, факт. 448.1465.

## Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly-β-Ala-ONHS (CX1-1)

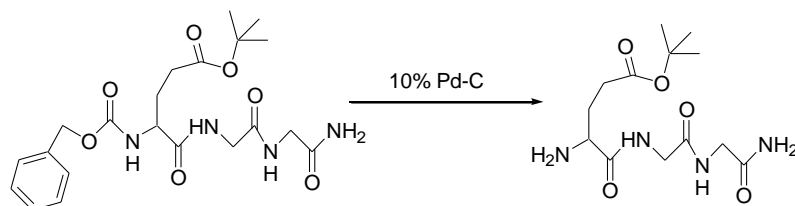


Розчиняли 76 міліграм (0,18 ммоль) Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OH, 72 міліграми (0,376 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіміду гідрохлориду і 66 міліграм (0,575 ммоль) N-гідроксисукциніміду в 1,0 мл диметилформаміду на магнітній мішалці. Через 2 години реакційну суміш очищали 2 рівними порціями методом зворотньофазової HPLC на колонці C8 1,9 см × 10 см. Колонку елюювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% 1,4-диоксану, при 18 мл/хв. протягом 3 хв., а потім протягом 15 хв. лінійним градієнтом від 5% 1,4-диоксану до 30% 1,4-диоксану. Фракції (час утримання = 6,5 хв.), які містять продукт, об'єднували в колбі і негайно заморожували в суміші сухого льоду з ацетоном. Видаляли розчинник за допомогою ліофілізації за кімнатної температури, отримуючи 40 мг (42%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.08-8.11 (m, 3H), 7.99 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.6-3.75 (m, 6H), 3.0-3.2 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.13 (t, J = 7.6 Hz), 1.83-1.93 (m, 2H), 1.69-1.72 (m, 2H). HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 545.1608, факт. 545.1638.

Z-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>

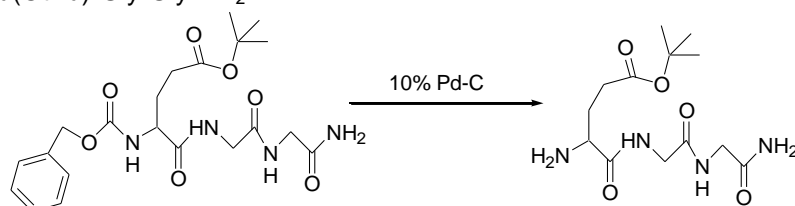
Додавали 40 мл диметилформаміду до 2,52 г (7,47 ммоль) Z-Glu(OtBu)-OH, 1,3 г (8,49 ммоль) гідроксибензотриазолу, 1,3 г (7,76 ммоль) H-Gly-Gly-NH<sub>2</sub> і 1,52 г (7,93 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіміду гідрохлориду. Додавали 2,5 мл (14,3 ммоль) діізопропілетиламіну і перемішували суміш протягом ночі. Реакційну суміш очищали 3 рівними порціями, які наносили безпосередньо на препаративну колонку C18 для HPLC 5 см × 25 см. Колонку елюювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% ацетонітрилу, при 100 мл/хв. протягом 10 хв., а потім протягом 15 хв. лінійним градієнтом від 5% ацетонітрилу до 90% ацетонітрилу. Фракції (час утримання = 18-20 хв.), які містять продукт, об'єднували і видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 2,9 г (83%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.79-7.68 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.27 (q, J = 4.9, 5H), 6.90 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.35 (d, J = 6.8, 1H), 5.08 (d, J = 12.0, 1H), 4.98 (d, J = 12.2, 1H), 4.20 (dd, J = 12.9, 7.6, 1H), 3.84-3.95 (m, 2H), 3.83 (d, J = 5.0, 2H), 2.42-2.19 (m, 2H), 2.07 (d, J = 6.9, 1H), 1.96-1.83 (m, 1H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (101 MHz, DMSO): δ 171.79, 171.65, 170.82, 168.87, 163.04, 156.08, 136.86, 128.31, 127.74, 79.64, 65.58, 53.96, 42.17, 41.81, 31.25, 27.73, 27.01.

H-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>



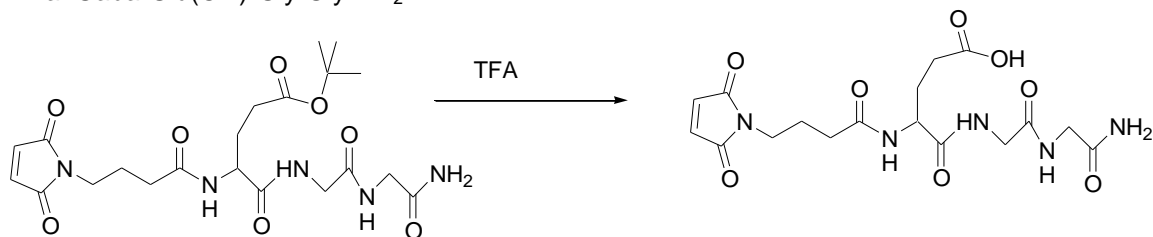
Розчиняли 940 міліграм (2,09 ммоль) Z-Glu(OtBu)-Gly-GlyNH<sub>2</sub> у 40 мл суміші метанол:деіонізована вода 95:5 в скляній колбі гідрогенізації Парра на 250 мл. У колбу додавали 222 міліграми 10% паладію на вуглеці і її вміст піддавали гідрогенізації із струшуванням в атмосфері водню (40 psi) протягом 4 годин. Суміш піддавали вакуум-фільтрації через особливий целюзовий фільтр, а з фільтрату видаляли розчинник на роторному випарнику, отримуючи 640 міліграм (94%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, DMSO): δ 4.03 (s, 1H), 3.75 (d, J = 3.3, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.30-3.22 (m, J = 3.6, 1H), 3.14-3.10 (m, 1H), 2.27 (t, J = 7.9, 2H), 1.84 (td, J = 13.6, 7.4, 1H), 1.63 (td, J = 15.0, 7.5, 1H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (101 MHz, MEOD): δ 176.53, 174.24, 172.00, 170.32, 81.82, 55.21, 43.64, 43.16, 40.44, 32.31, 30.45, 28.41. HRMS: (M+H<sup>+</sup>) теор. 317.1825, факт. 317.1800.

Mal-Gaba-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>



Розчиняли 603 мг (1,9 ммоль) N-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>, 372 міліграми (2,03 ммоль) Mal-Gaba-OH і 430 міліграм (2,24 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодііміду гідрохлориду в 4,5 мл диметилформаміду і 800 мкл дихлорметану. Суміш перемішували протягом 3 годин за кімнатної температури. Реакційну суміш очищали 2 рівними порціями, які наносили безпосередньо на препаративну колонку C18 для HPLC 5 см × 25 см. Колонку елювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% ацетонітрилу, при 100 мл/хв. протягом 10 хв., а потім протягом 15 хв. лінійним градієнтом від 5% ацетонітрилу до 90% ацетонітрилу. Фракції (час утримання = 17,4-19,2 хв.), які містять продукт, об'єднували і видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 2,9 г (83%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.16 (t, J = 5.7, 1H), 8.06 (d, J = 7.4, 1H), 7.99 (t, J = 5.8, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.06 (s, 2H), 4.18 (dd, J = 13.4, 7.9, 1H), 3.70 (d, J = 5.7, 2H), 3.62 (d, J = 5.8, 2H), 3.42-3.37 (m, 2H), 2.23 (t, J = 8.0, 2H), 2.12 (dd, J = 8.1, 6.4, 2H), 1.87 (dt, J = 14.2, 7.9, 1H), 1.70 (dt, J = 13.7, 6.8, 2H), 1.38 (s, 9H); <sup>13</sup>C-ЯМР (101 MHz, DMSO): δ 173.12, 171.77, 171.65, 171.03, 170.79, 168.89, 134.43, 79.62, 52.02, 42.14, 41.81, 36.80, 32.29, 31.22, 27.73, 26.95, 24.02. HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 504.2070, факт. 504.2053.

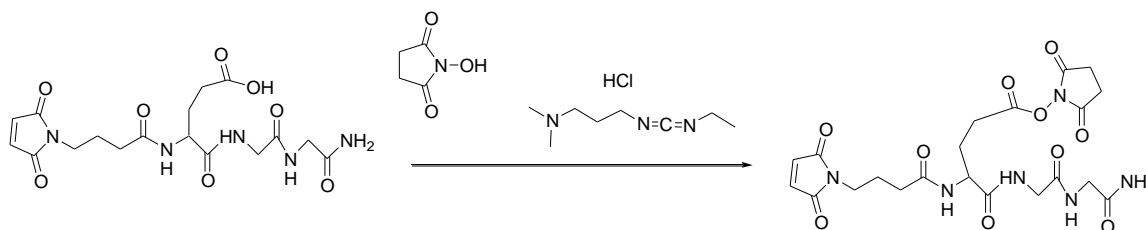
Mal-Gaba-Glu(OH)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>



Розчиняли 105 мг (0,218 ммоль) Mal-Gaba-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub> у 5 мл суміші трифтороцтова кислота:деіонізована вода 95:5 і перемішували на магнітній мішалці протягом 2 годин. Розчинник видаляли на роторному випарнику, а залишок розчиняли в 6 мл ацетонітрилу + 1,5 мл толуолу, отримуючи суспензію. З суспензії видаляли розчинник на роторному випарнику під вакуумом, отримуючи 92 мг (100%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, DMSO): δ 6.99 (s, 2H), 4.18 (dd, J = 8.2, 5.7, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.40 (t, J = 6.8, 2H), 2.26 (t, J = 7.8, 2H), 2.19-2.05 (m, 2H), 1.90 (dt, J = 13.7, 7.4, 1H), 1.73 (dt, J = 14.2, 7.5, 3H); <sup>13</sup>C-ЯМР (101 MHz, DMSO): δ 173.76, 171.72, 170.99, 170.70, 168.81, 134.37, 52.00, 41.97, 41.63, 36.75, 32.19, 29.95, 26.79, 23.93.

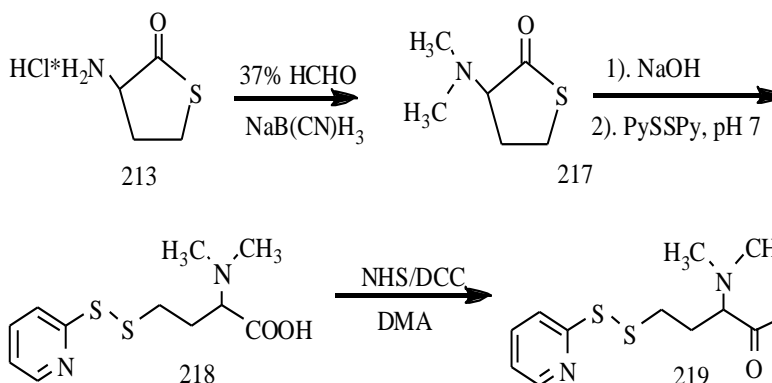
Mal-Gaba-Glu(ONHS)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>





Перемішували 94 мг (0,22 ммоль) Mal-Gaba-Glu(OH)-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>, 75 мг (0,65 ммоль) N-гідроксисукциніміду і 110 мг (0,57 ммоль) N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодііміду гідрохлориду в 1 мл диметилформаміду на магнітній мішалці протягом 3 годин. Неочищену реакційну суміш очищали 3 рівними порціями, які наносили безпосередньо на колонку C8 1,9 см × 10 см. Колонку елюювали деіонізованою водою, яка містить 0,3% мурашиної кислоти і 5% 1,4-диоксану, при 18 мл/хв. протягом 3 хв., а потім протягом 18 хв. лінійним градієнтом від 5% 1,4-диоксану до 30% 1,4-диоксану. Фракції (час утримання = 6,5 хв.), які містять продукт, збирали в колбу і негайно заморожували в суміші сухого льоду з ацетоном. Об'єднаний заморожений матеріал ліофілізували, отримуючи 80 мг (70%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, DMSO): δ 8.20 (t, J = 5.4, 1H), 8.13 (d, J = 7.3, 1H), 8.03 (t, J = 5.6, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 4.29 (dd, J = 13.7, 6.5, 1H), 3.84-3.69 (m, 2H), 3.63 (d, J = 5.7, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.41 (t, J = 6.8, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.78-2.69 (m, 2H), 2.15 (dd, J = 9.1, 6.2, 1H), 2.10-1.95 (m, 1H), 1.88 (dt, J = 17.0, 7.5, 1H), 1.73 (dd, J = 14.0, 6.9, 2H). HRMS: (M+Na<sup>+</sup>) теор. 545.1608, факт. 545.1627.

Приклад 6. Синтез позитивно заряджених лінкерів



3-(Диметиламіно) дигідротіофен-2(3H)-он (217)

У розчин 3-амінодигідротіофен-2(3H)-ону гідрохлориду (213) (1,0 г, 6,51 ммоль) і формальдегіду (3 мл, 40,3 ммоль) в метанолі додавали ціаноборгідрид натрію (0,409 г, 6,51 ммоль) п'ятьма порціями протягом 1 години. Після перемішування протягом 2 годин суміш випаровували, знову розчиняли в EtAc, промивали 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували, концентрували і очищали на колонці з SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю MeOH/DCM 1:30), отримуючи 0,812 г (86%) вказаної в заголовку сполуки. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.49 (dd, 1H, J = 6.3, 12.1 Hz), 3.24 (m, 2H), 2.42 (s, 6H), 2.38 (m, 1H), 2.21 (m, 1H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 206.58, 73.24, 41.62, 27.47, 25.51. ESI MS: m/z+ 146.0 (M+H), 168.0 (M+Na).

2-(Диметиламіно)-4-(піридин-2-іл)дисульфаніл)бутанова кислота (218)

3-(Диметиламіно) дигідротіофен-2(3H)-он (217) (0,95 г, 6,54 ммоль) в розчині з 15 мл 0,5 M NaOH і 10 мл метанолу перемішували протягом 30 хв., нейтралізували H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> до pH 7,2 і додавали 1,2-ди(піридин-2-іл) дисульфан (5,76 г, 26,2 ммоль) в 50 мл метанолу. Суміш перемішували протягом ночі, концентрували, промивали EtAc, а водний розчин наносили на колонку C-18 і елюювали градієнтом від 5% метанолу в 0,01% мурашиній кислоті до 30% метанолу в 0,01% мурашиній кислоті, отримуючи вказаний в заголовку продукт (368 мг, вихід = 20,65%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 8.31 (dd, 1H, J = 0.7, 4.7 Hz), 7.77 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H, J = 0.8, 5.8 Hz), 3.22 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.51 (s, 6H), 2.05 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 175.00, 161.28, 150.46, 139.40, 122.60, 121.49, 71.20, 42.46, 36.29, 29.88. ESI MS: m/z+ 272.9 (M+H), 295.0 (M+Na).

2,5-Діоксопіролідин-1-іл-2-(диметиламіно)-4-(піридин-2-іл)дисульфаніл)-бутаноат (219)

2-(Диметиламіно)-4-(піридин-2-іл)дисульфаніл)бутанову кислоту (218) (92 мг, 0,338 ммоль), 1-гідроксипіролідин-2,5-діон (65 мг, 0,565 ммоль) і EDC (185 мг, 0,965 ммоль) в 3 мл DMA перемішували при 50 °C протягом ночі. Суміш випаровували і очищали на колонці з SiO<sub>2</sub> (елюювали сумішшю метанол/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> від 1:10 до 1:4), отримуючи 43 міліграми (35%) вказаного в заголовку продукту. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 8.40 (m, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.82 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.66 (s, 6H), 1.98 (m, 2H); <sup>13</sup>C-ЯМР: 177.21, 161.78, 161.12, 150.68, 139.37,

122.70, 121.66, 70.80, 44.16, 43.15, 36.06, 27.38. ESI MS:  $m/z + 369.2$  (M+H).

Приклад 7. Отримання кон'югатів huMy9-6-CX1-1-DM1 з попередником зарядженого лінкера Використовували наступні початкові розчини: (1) 39,6 мМ DM1 в DMA; (2) 17,8 мМ розчин лінкера CX1-1 в DMA; (3) 200 мМ сукцинатний буфер рН 5,0 з 2 мМ EDTA. Реакційну суміш, яка містить 8, 12 або 16 еквівалентів лінкера на 1 антитіло, вносили до розчину антитіла при 4 мг/мл в 90% фосфатному буфері рН 6,5/ 10% DMA і залишали реагувати на 2 години при 25 °С, рН 5,0, після чого проводили реакцію з DM1.

Кон'югат Ab відокремлювали від зайвих невеликих молекул реагентів на колонці G25, урівноважений в PBS рН 7,4. Очищений кон'югат залишали на 2 дні при 25 °С, щоб гідролізувались лабільні зв'язки з препаратом, після чого кон'югат піддавали додатковому очищенню від вільного препарату шляхом діалізу в PBS протягом ночі, а потім в буфері з 10 мМ гістидину/130 мМ гліцину рН 5,5 (1 раз протягом ночі). Діалізований кон'югат фільтрували крізь фільтр на 0,2 мкм і піддавали спектрометрії UV/Vis, щоб обчислити число молекул майтансиноїду на Ab, використовуючи відомі коефіцієнти екстинкції для майтансиноїду і антитіл при 252 і 280 нм. Вихід склав ~70%, а число молекул майтансиноїду на 1 антитіло для кожного кон'югата коливалося від 3,7 до 6,8 залежно від використаного надлишку лінкера.

Приклад 8. Фармакокінетика *in vivo*

Фармакокінетику кон'югатів із зарядженим лінкером Sulfo-Mal гуманізованого антитіла C242 з  $^3\text{H}$ -міченим DM4 (3,5 і 6,4 DM4/Ab) в плазмі у мишей CD-1 аналізували методом ELISA на антитіло і методом  $^3\text{H}$ -радіометрії (Фіг. 72). Кон'югати Ab-сульфо-Mal- $^3\text{H}$ -DM4, які несуть 3,5 і 6,4 DM4/Ab, вводили *i.v.* у дозах 12,9 і 7,9 мг/кг (доза антитіл), відповідно. Вміст антитіл в зразках плазми вимірювали методом ELISA (уловлювання за допомогою козиного антитіла проти IGG людини і детектування за допомогою кон'югата осячого антитіла проти huIgG з пероксидазою хрину) і методом  $^3\text{H}$ -радіометрії (сцинтиляційний лічильник). З Фіг. 72A видно, що ці два методи вимірювання концентрації кон'югатів – ELISA і  $^3\text{H}$ -радіометрія – давали близькі значення для кожного кон'югата. Обидва кон'югата Ab-сульфо-Mal-DM4 з 3,5 і 6,4 DM4/Ab проявляли хорошу стабільність в плазмі впродовж 4 тижнів з періодом напівжиття приблизно 14,9 і 9,7 днів, відповідно, що є близьким до періоду напівжиття приблизно 11,8 днів у некон'югованого антитіла. Співвідношення DM4/Ab у цих двох кон'югатів Ab-сульфо-Mal-DM4 (початково 3,5 і 6,4 D/A) також було стійким впродовж 4 тижнів циркуляції в плазмі, причому навіть за відносно високого навантаження в 6,4 D/A (Фіг. 72B). Період напівжиття сполученого через сульфо-Mal кон'югата huC242 Ab-сульфо-Mal-DM4 з навантаженням в 3,5 D/A при введенні в дозі 12,9 мг/кг склав 14,9 днів (AUC = 38449 год·мкг/мл) в порівнянні з періодом напівжиття в 12,6 днів (AUC = 25910 год·мкг/мл) у сполученого через SMCC кон'югата huC242 Ab-SMCC-DM1 з схожим навантаженням в 4,2 D/A при введенні в дозі 12 мг/кг, що свідчить про велике покращення у порівнянні з кон'югатом на основі SMCC (Фіг. 38B).

Таблиця 1. Порівняння лінкерів на основі SSNPP і SPP при кон'югації антитіла N901 з DM1. Кон'югація проводилася протягом 2 годин за вказаного значення рН, використовуючи 1,7-кратний молярний надлишок DM1 над лінкером.

Лінкер	рН	Лінкер/Ab	DM1/Ab	Ефективність (%)	Вільний препарат (%)	SEC-аналіз			
						Мономер	Димер	Тример	HMW
SSNPP	7,4	4,1	3,8	93	0,8	91,9	6,3	0,6	0,1
SPP	7,4	5,6	4,3	77	1,8	93,6	4,9	0,4	0,2
SSNPP	6,5	4,0	3,7	93	0,9	-	-	-	-
SPP	6,5	6,6	4,6	70	1,9	-	-	-	-

Таблиця 2. Зниження співвідношення лінкер/антитіло, необхідного для досягнення заданого співвідношення DM1/антитіло, при використанні SSNPP як лінкера. Кон'югація проводилася протягом 2 годин при рН 7,4, використовуючи 1,1-кратний молярний надлишок DM1 над лінкером.

Лінкер	Лінкер/ab	DM1/Ab
SSNPP	4,2	4,3
SPP	5,6	4,3

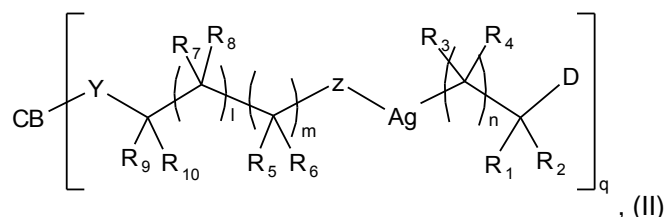
Таблиця 3. Порівняння лінкерів на основі SSNPP і SPP при кон'югації антитіла N901 з DC4. Кон'югація проводилася протягом вказаного часу при рН 7,4, використовуючи 1,4-кратний молярний надлишок DC4 над лінкером.

Лінкер	Час, год.	Лінкер/ab	DC4/Ab	Ефективність (%)
SSNPP	2	4,2	4,3	102
SSNPP	18	4,2	4,1	98
SPP	2	5,6	4,1	73
SPP	18	5,6	5,1	91

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Кон'югат клітинозв'язувальної речовини з лікарським препаратом формули (II):



де: СВ позначає клітинозв'язувальну речовину; де клітинозв'язувальна речовина є антитілом або фрагментом антитіла, яке зв'язується з клітинами мішені;

10 D позначає цитотоксичний лікарський препарат, сполучений з клітинозв'язувальною речовиною дисульфідним, тіоефірним, складнотіоефірним, пептидним, гідразоновим, ефірним, складноефірним, карбаматним або амідним зв'язком;

15 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, що містить 2-6 атомів вуглецю, заряджений замісник, вибраний із аніонів з-поміж SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів з-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук, N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, або феніл, причому:

20 R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>13</sub> є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

25 A позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний із аніонів з-поміж SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів з-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук, N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, де X має ті ж значення, що і вище, а g=0 або 1;

30 Z відсутній за умови, що принаймні один з-поміж R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником, а якщо g=1, то щонайменше один з A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником; і

Y позначає карбонільну, тіоефірну, амідну або дисульфідну; а q позначає ціле число від 1 до 20.

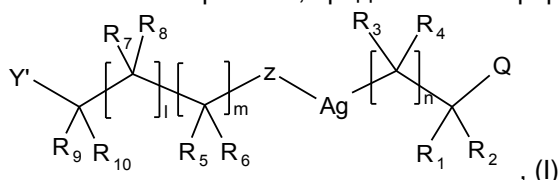
35 2. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому D вибраний з-поміж майтансиноїдів, аналогів CC-1065, морфоліно, доксорубіцину, таксанів, каліхеаміцинів, ауристатинов, піролобензодіазепіну, siRNA або їх комбінацій; і їх фармацевтично прийнятних солей, кислот або похідних.

40 3. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітинозв'язувальна речовина зв'язується з клітинами мішені, вибраними з-поміж клітин пухлин, клітин заражених вірусами, заражених мікроорганізмами клітин, заражених паразитами клітин, аутоімунних клітин, активованих клітин, мієлоїдних клітин, активованих Т-клітин, В-клітин або меланоцитів, клітин, які експресують один або декілька антигенів з-поміж IGF-IR, CanAg, EGFR, рецептора EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, My9, анти-B4, EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD 11a, CD18, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, рецепторів EphA, рецепторів EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2/neu, HER3, мезотеліну, крипто, альфа<sub>v</sub>/бета<sub>3</sub>-інтегрину, альфа<sub>v</sub>/бета<sub>5</sub>-інтегрину, альфа<sub>v</sub>/бета<sub>6</sub>-інтегрину, Aro2 і C242; або клітин, які експресують рецептори інсуліноподібного фактора росту, рецептори епідермального фактора росту або рецептори фолату.

45 4. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому клітинозв'язувальна речовина є одноланцюговим антитілом, фрагментом антитіла, який зв'язується з клітинами мішені,

моноклональним антитілом, одноланцюговим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла, який зв'язується з клітинами мішені, химерним антитілом, фрагментом химерного антитіла, який зв'язується з клітинами мішені, доменним антитілом або фрагментом доменного антитіла, який зв'язується з клітинами мішені.

5. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло є перебудованим антитілом, перебудованим одноланцюговим антитілом або фрагментом перебудованого антитіла.
6. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло є моноклональним антитілом, одноланцюговим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла.
7. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло є людським антитілом, гуманізованим антитілом або перебудованим антитілом, гуманізованим одноланцюговим антитілом або фрагментом гуманізованого антитіла.
8. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло є химерним антитілом, фрагментом химерного антитіла, доменним антитілом або фрагментом доменного антитіла.
9. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло є антитілом My9-6, B4, C242, N901, DS6, проти EpCAM, до рецептора EphA2, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, трастузумабом, пертузумабом, біватузумабом, сибротузумабом або ритуксимабом.
10. Кон'югат за п. 3, який **відрізняється** тим, що в ньому пухлинні клітини вибрані з-поміж клітин раку молочної залози, раку простати, раку яєчників, раку товстої і прямої кишки, раку шлунку, плоскоклітинного раку, дрібноклітинного раку легенів і раку яєчка.
11. Застосування кон'югата за п. 1 для виготовлення лікарського засобу для лікування пухлин.
12. Зшиваючий реагент, представлений формулою (I):



де: Y' позначає реагуючу з аміном групу або що реагує з тіолом групу;

Q позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість приєднання цитотоксичного лікарського препарату через дисульфідний, тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, ефірний, складноефірний, карбаматний або амідний зв'язок, де Q вибирають з групи, що складається з тіолу, дисульфиду, аміно, карбокси, альдегіду, малеїмиду, гало ацетилу, гідразину і гідрокси;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкиніл, який містить 2-6 атомів вуглецю, заряджений замісник, вибраний з аніонів з-поміж SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів з-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук, N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або феніл, причому:

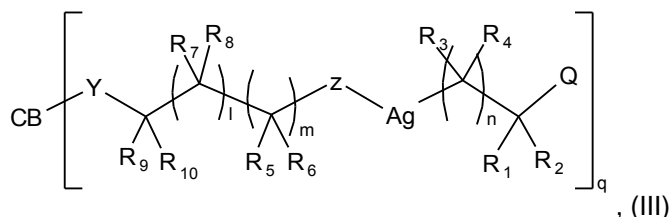
R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>13</sub> є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає феніл або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

l, m і n дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

A позначає феніл або заміщений феніл, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний із аніонів з-поміж SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, X-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> і катіонів з-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук, N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub> або X-N<sup>+</sup>R<sub>11</sub>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>, де X має ті ж значення, що і вище, а g=0 або 1; i

Z відсутній за умови, що принаймні один з-поміж R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником, а якщо g=1, то принаймні один з-поміж A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> і R<sub>10</sub> є зарядженим замісником.

13. Сполука формули (III):



де: СВ позначає клітинозв'язувальну речовину, де клітинозв'язувальна речовина є антитілом або фрагментом антитіла, яке зв'язується з клітинами мішені;

Q позначає функціональну групу, яка зумовлює можливість приєднання цитотоксичного лікарського препарату через дисульфідний, тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, ефірний, складноефірний, карбаматний або амідний зв'язок, де Q вибирають з групи, що складається з тіолу, дисульфиду, аміно, карбокси, альдегіду, малеїміду, гало ацетилу, гідразину і гідрокси;

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю, заряджений замісник, вибраний з аніонів 3-поміж  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  і катіонів 3-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або фенол, причому:

$R_{11}, R_{12}$  і  $R_{13}$  є однаковими або різними і позначають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає фенол або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

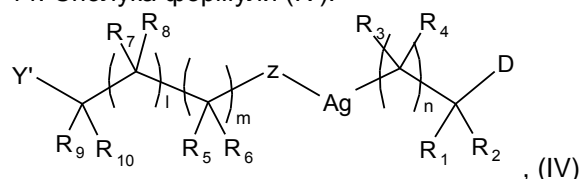
$l, m$  і  $n$  дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

A позначає фенол або заміщений фенол, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний з аніонів 3-поміж  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  і катіонів 3-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , де X має ті ж значення, що і вище, а  $g=0$  або 1;

Z відсутній за умови, що принаймні один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, а якщо  $g=1$ , то щонайменше один з A,  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником; і

Y позначає карбонільну, тіоефірну, амідну або дисульфідну групу; а q позначає ціле число від 1 до 20.

14. Сполука формули (IV):



де: Y' позначає реагуючу з аміном групу або що реагує з тіолом групу;

D позначає цитотоксичний лікарський препарат, сполучений з клітинозв'язувальною речовиною через дисульфідний, тіоефірний, складнотіоефірний, пептидний, гідразоновий, ефірний, складноефірний, карбаматний або амідний зв'язок;

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, лінійний, розгалужений або циклічний алкеніл або алкініл, який містить 2-6 атомів вуглецю, заряджений замісник, вибраний з аніонів 3-поміж  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  і катіонів 3-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або фенол, причому:

$R_{11}, R_{12}$  і  $R_{13}$  є однаковими або різними і означають H, лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, а X позначає фенол або лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю;

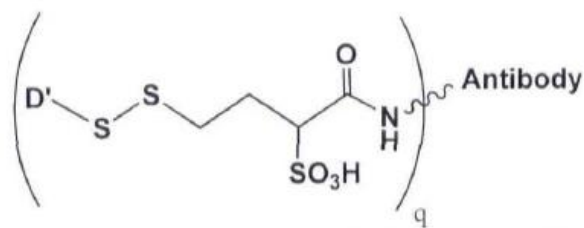
$l, m$  і  $n$  дорівнюють 0 або цілому числу від 1 до 4;

A позначає фенол або заміщений фенол, причому замісником є лінійний алкіл, який містить 1-6 атомів вуглецю, або розгалужений або циклічний алкіл, який містить 3-6 атомів вуглецю, або ж заряджений замісник, вибраний з аніонів 3-поміж  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $PO_3^{2-}$ ,  $X-PO_3^{2-}$ ,  $CO_2^-$  і катіонів 3-поміж азотовмісних гетероциклічних сполук,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  або  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , де X має ті ж значення, що і вище, а  $g=0$  або 1; і

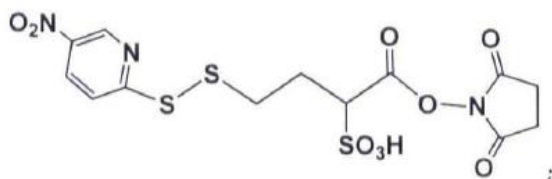
Z відсутній за умови, що принаймні один з-поміж  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, а якщо  $g=1$ , то щонайменше один з-поміж A,  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником.

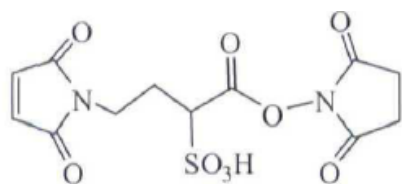
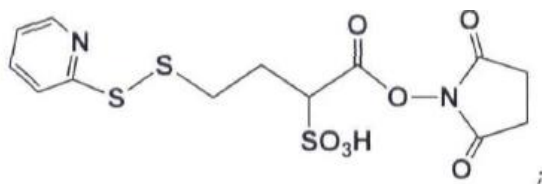
15. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість кон'югата за будь-яким з пп. 1, 2-10 та 16-25 або його фармацевтично прийнятної солі або сольовату, а також фармацевтично прийнятний носій, розчинник або наповнювач.

16. Кон'югат за будь-яким з пп. 1 і 2-10, який **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, вибраним з  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  і  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; D є майтансиноїдом, аналогом CC-1065 або димером піролобензодіазепіну.
- 5 17. Кон'югат за будь-яким з пп. 1 і 2-10, який **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є  $SO_3^-$  або  $X-SO_3^-$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; D є майтансиноїдом, аналогом CC-1065 або димером піролобензодіазепіну, приєднаним через дисульфідний, тіоефірний або складнотіоефірний зв'язок.
- 10 18. Кон'югат за будь-яким з пп. 1 і 2-10, який **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є  $SO_3^-$  або  $X-SO_3^-$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; D є майтансиноїдом.
19. Кон'югат за п. 1, який **відрізняється** тим, що представлений наступною формулою:

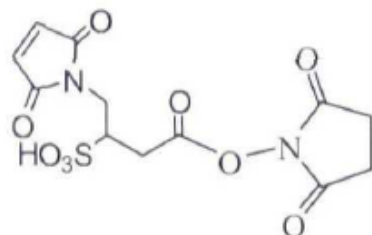


- в якій D'-S-S означає цитотоксичний лікарський препарат, з'єднаний з клітинозв'язувальною речовиною через дисульфідний зв'язок, а Antibody—NH є клітинозв'язувальною речовиною, пов'язаною з цитотоксичним лікарським препаратом через аміногрупу лізину.
- 15 20. Кон'югат за п. 19, який **відрізняється** тим, що цитотоксичний лікарський препарат є майтансиноїдом.
21. Кон'югат за п. 20, який **відрізняється** тим, що цитотоксичний лікарський препарат є DM4.
22. Кон'югат за будь-яким з пп. 19-21, в якому антитіло зв'язане з рецептором фолату.
- 20 23. Кон'югат за п. 22, в якому рецептором фолату є FOLR1 (рецептор фолату 1).
24. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що Y' означає реагуючий з аміном реагент.
- 25 25. Зшиваючий реагент за п. 24, який **відрізняється** тим, що реагуючий з аміном реагент вибраний з групи, яка складається зі складних ефірів N-гідроксисукциніміду, складних ефірів п-нітрофенілу, складних ефірів динітрофенілу, складних ефірів пентафторфенілу.
26. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що Y' означає реагуючий з тіолом реагент.
27. Зшиваючий реагент за п. 26, який **відрізняється** тим, що реагуючий з тіолом реагент вибраний з групи, яка складається з піридилдисульфідів, нітропіридилдисульфідів, малеїмідів, галоацетатів і складних ефірів карбонових кислот.
- 30 28. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, вибраним з  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  і  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; i Q і Y', незалежно один від одного, означають дисульфід, малеїмід, галоацетил або складний ефір N-гідроксисукциніміду.
- 35 29. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, вибраним з  $SO_3^-$  або  $X-SO_3^-$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; Q означає дисульфід, малеїмід або галоацетил; i Y' означає малеїмід або складний ефір N-гідроксисукциніміду.
30. Зшиваючий реагент за п. 29, який **відрізняється** тим, що Q означає піридилдитіо- або нітропіридилдитіогрупу, групу малеїміду або галоацетила; а Y' означає складний ефір N-гідроксисукциніміду.
- 40 31. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що представлений наступною формулою:





або



32. Сполука за п. 13, яка **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, вибраним з  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  і  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , а останні - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; Q означає групу дисульфїду, малеїмїду, галоацетилу або складного ефіру N-гїдроксисукцинімїду; i Y означає тїоефір, амїд або дисульфїд.

33. Сполука за п. 13, яка **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є  $SO_3^-$  або  $X-SO_3^-$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; Q означає групу дисульфїду, малеїмїду або галоацетилу; i Y означає тїоефір, амїд або дисульфїд.

34. Сполука за п. 33, яка **відрізняється** тим, що Q означає піридилдитїо- або нїтропіридилдитїогрупу.

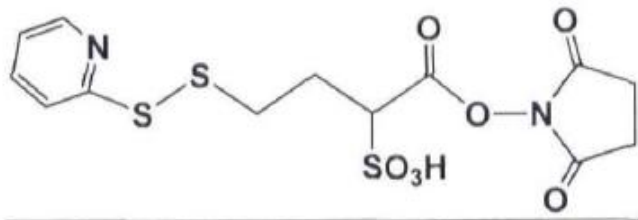
35. Сполука за п. 14, яка **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є зарядженим замісником, вибраним з  $SO_3^-$ ,  $X-SO_3^-$ ,  $OPO_3^{2-}$ ,  $X-OPO_3^{2-}$ ,  $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$  і  $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ , а останні - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; Y' означає групу дисульфїду, малеїмїду, галоацетилу або складного ефіру N-гїдроксисукцинімїду.

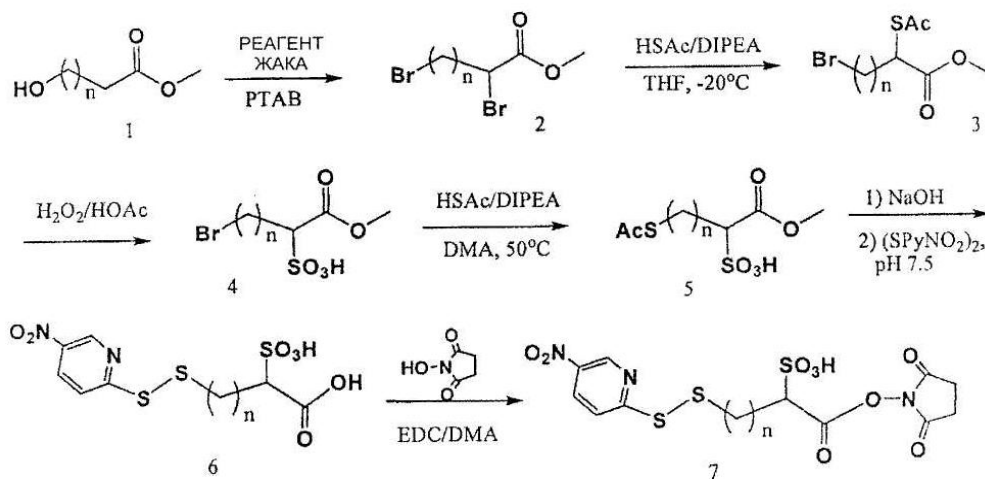
36. Сполука за п. 14, яка **відрізняється** тим, що один з  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9$  і  $R_{10}$  є  $SO_3^-$  або  $X-SO_3^-$ , а решта - H; l, g і m кожен рівний 0; n рівний 1; i Y' означає групу малеїмїду або складного ефіру N-гїдроксисукцинімїду.

37. Сполука за п. 36, яка **відрізняється** тим, що Y' означає складний ефір N-гїдроксисукцинімїду.

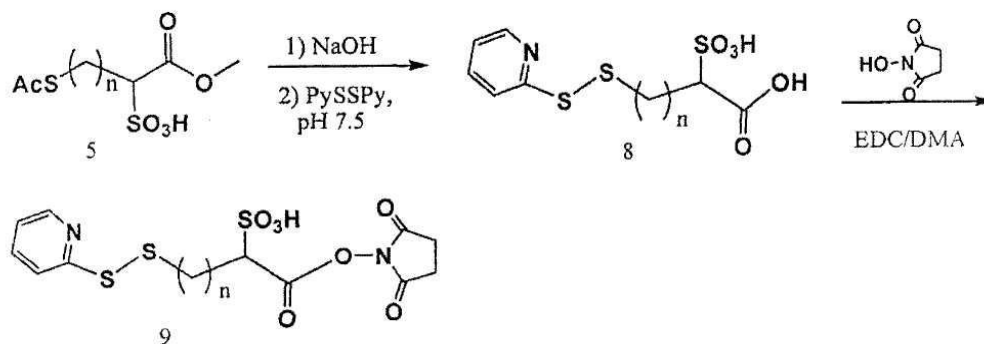
38. Сполука за будь-яким з пп. 14 і 35-37, яка **відрізняється** тим, що цитотоксичним лїкарським препаратом є майтансїноїд.

39. Зшиваючий реагент за п. 12, який **відрізняється** тим, що представлений наступною формулою:

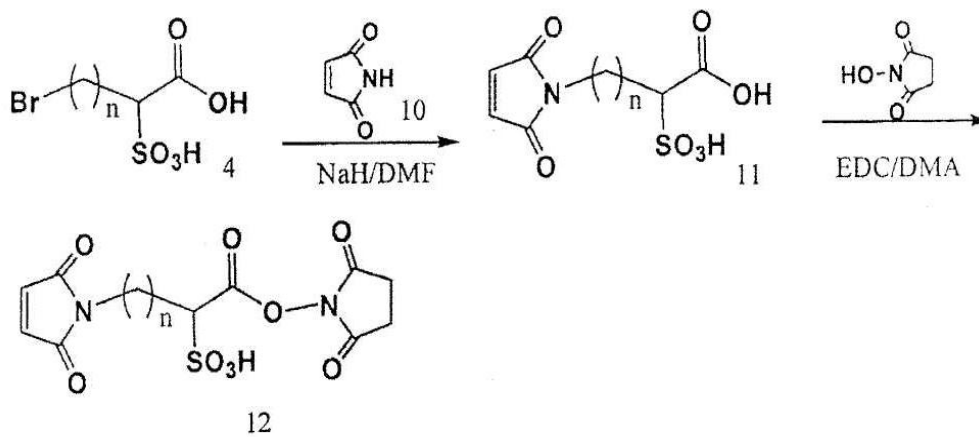




Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



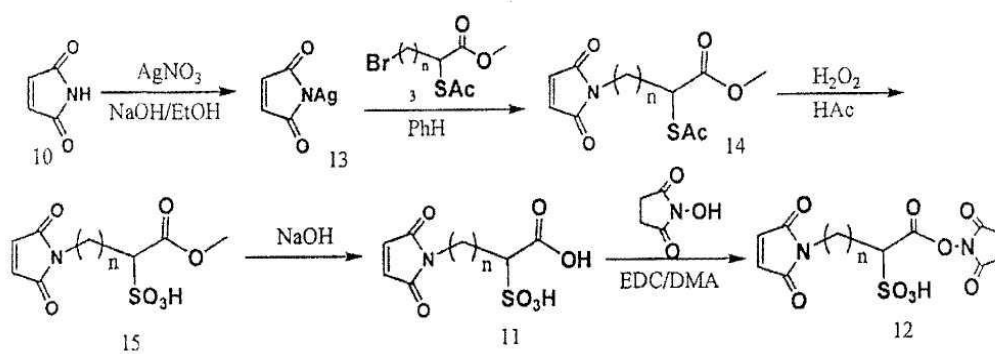


Fig. 4

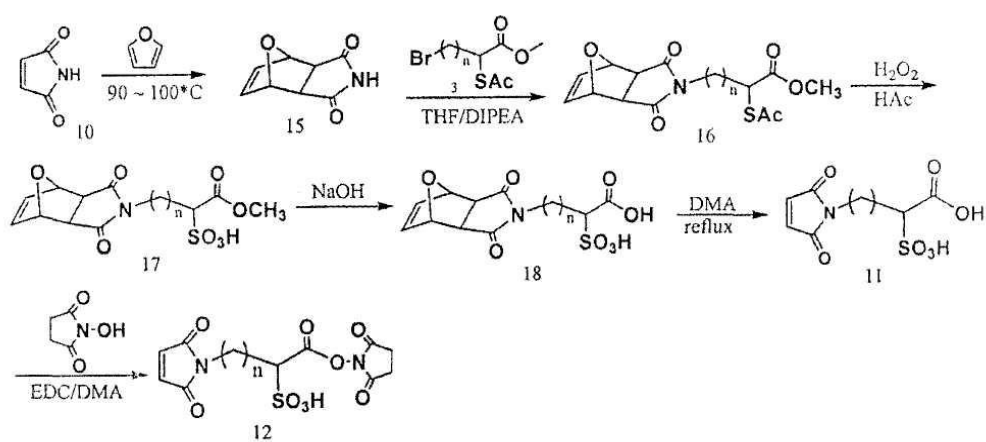


Fig. 5

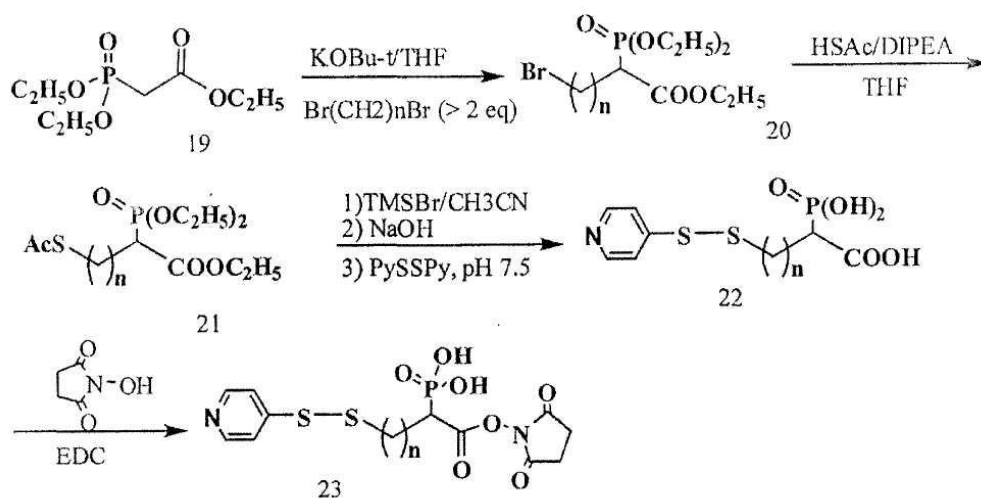


Fig. 6

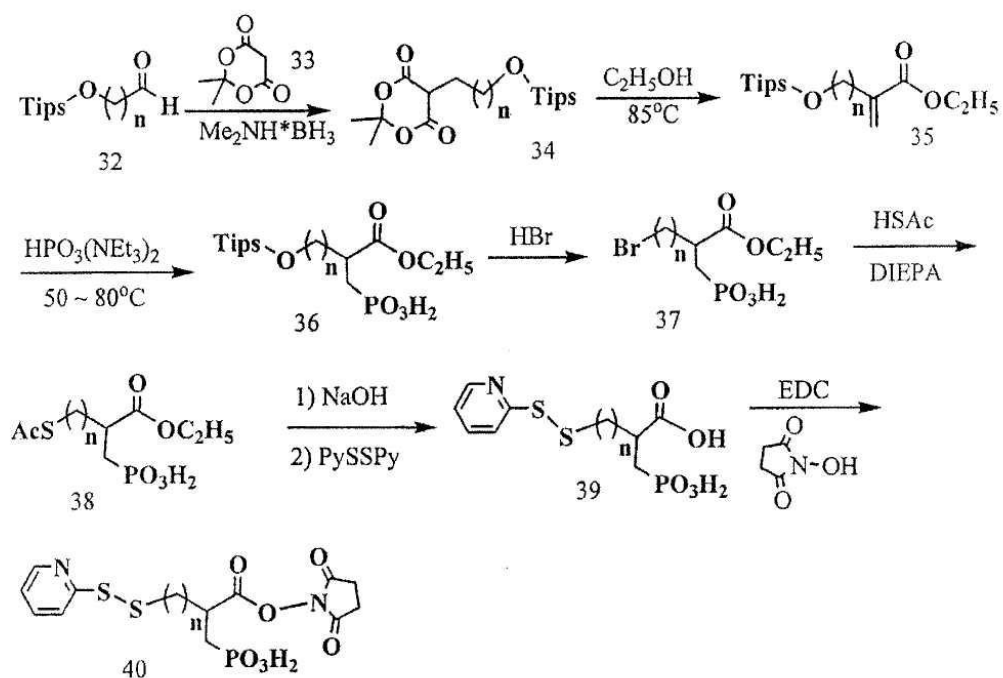


Fig. 7

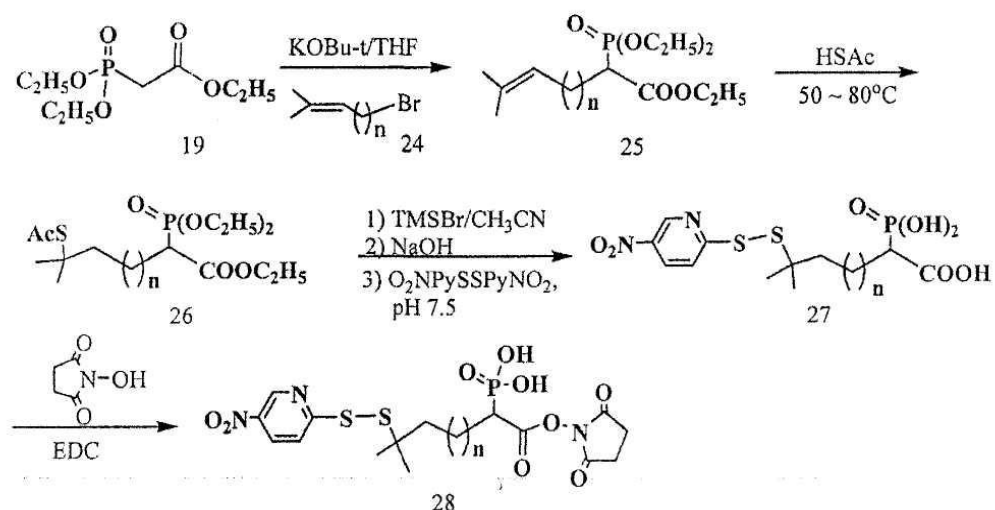


Fig. 8

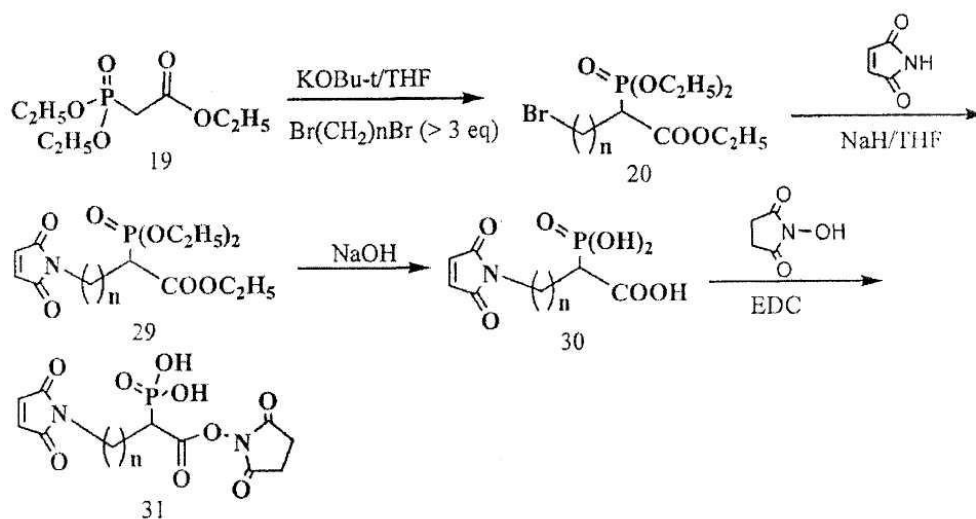


Fig. 9

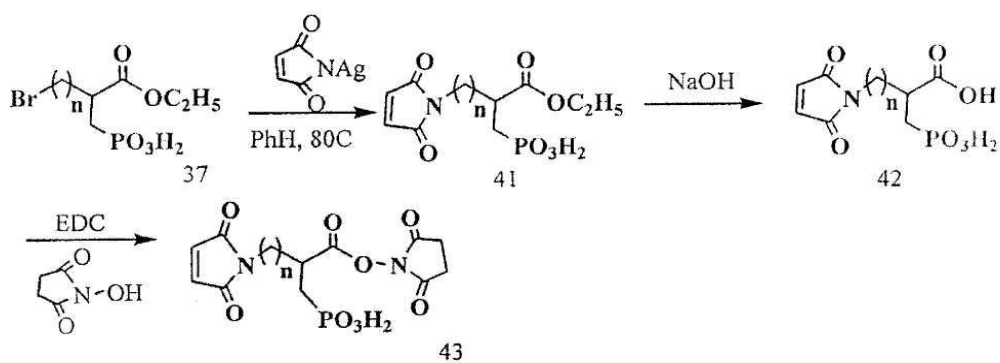


Fig. 10

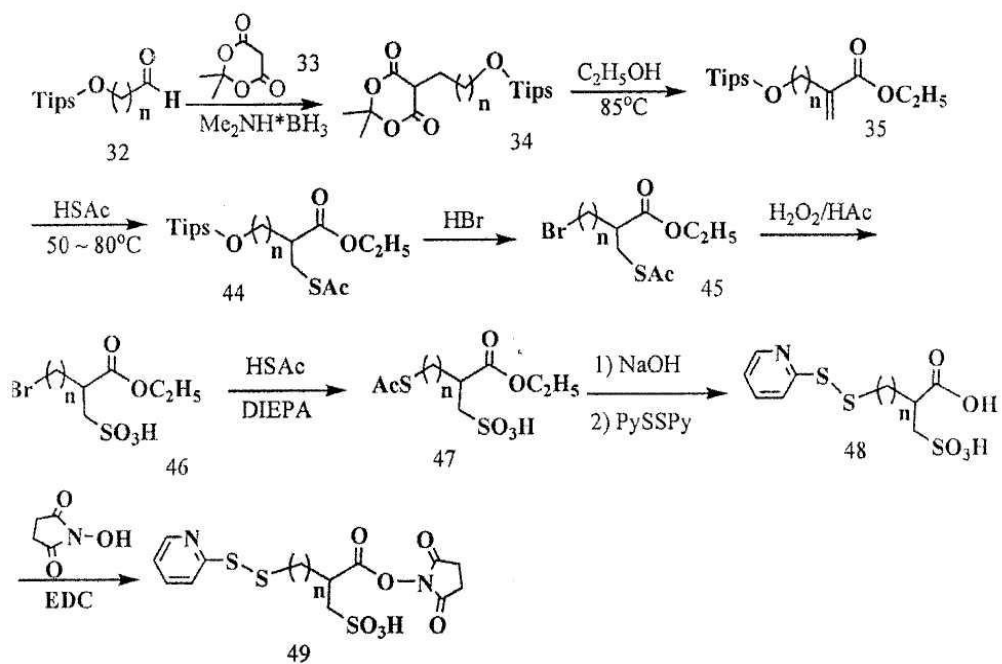


Fig. 11

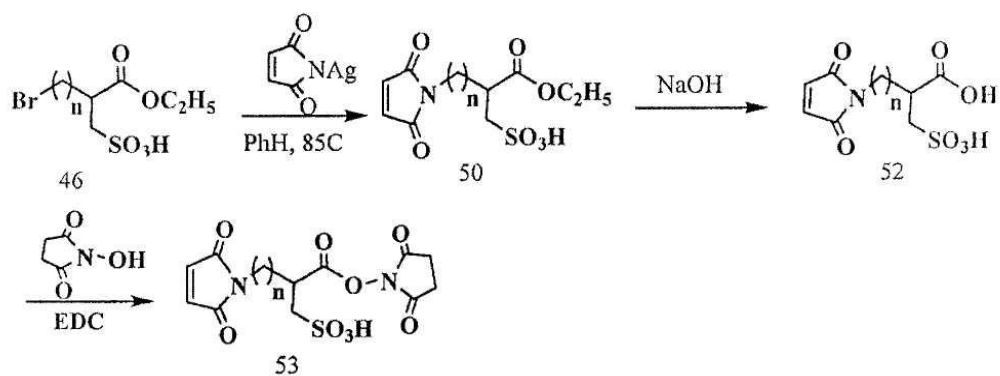


Fig. 12

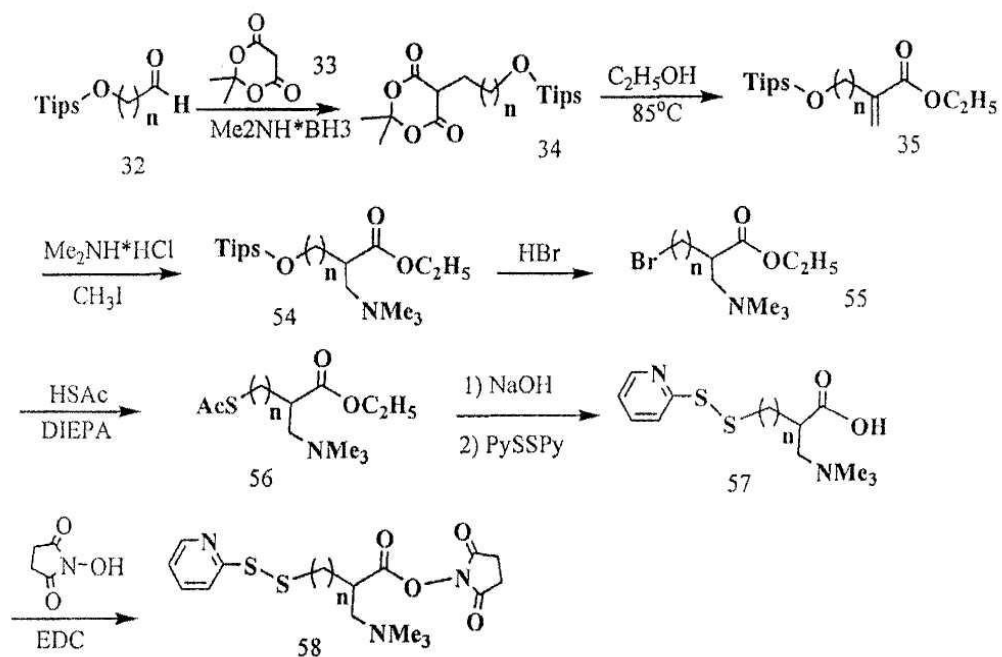


Fig. 13

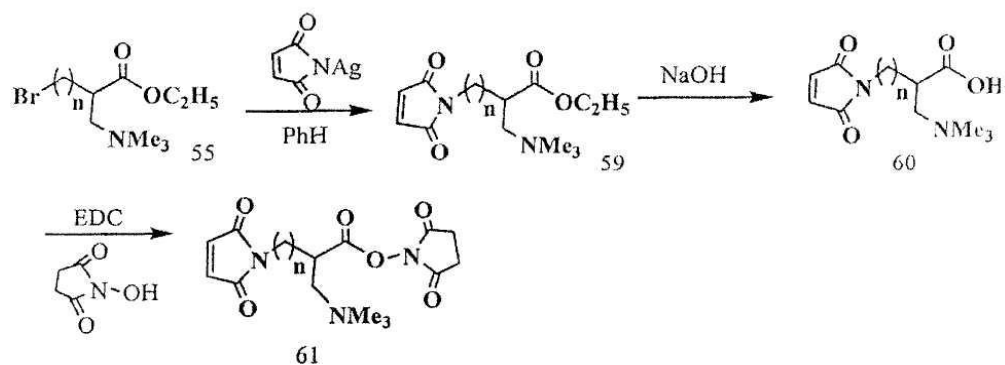


Fig. 14

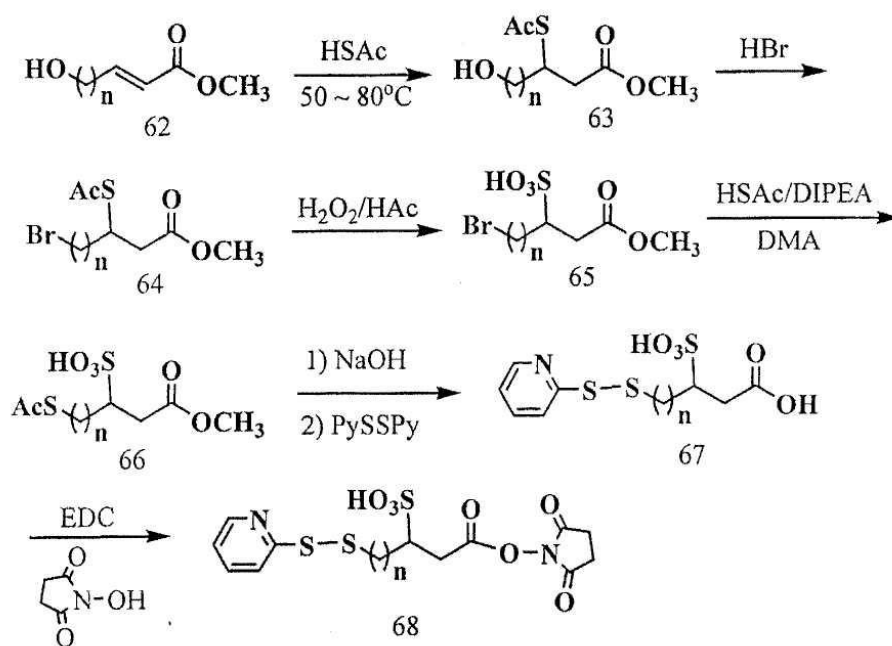


Fig. 15

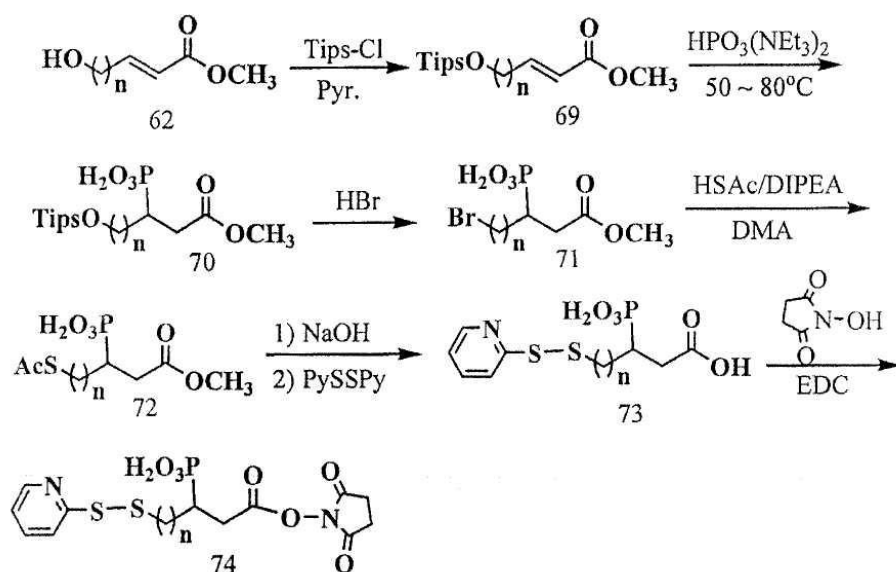


Fig. 16

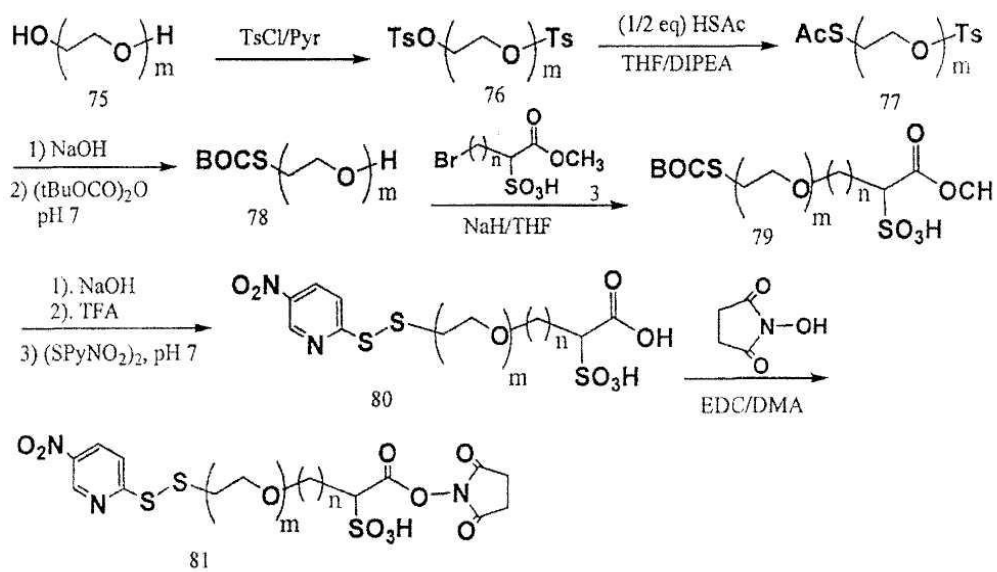


Fig. 17

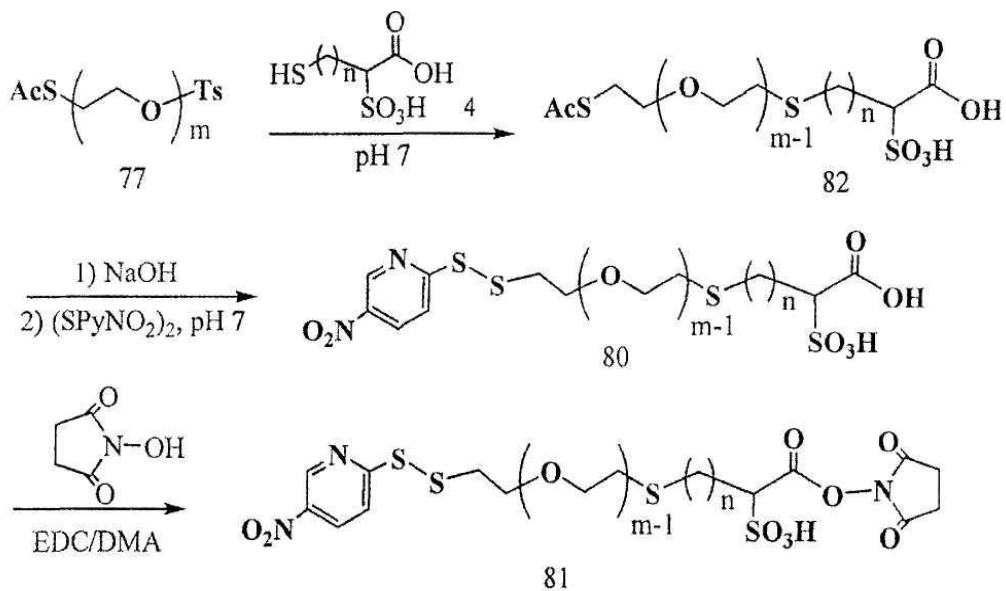


Fig. 18





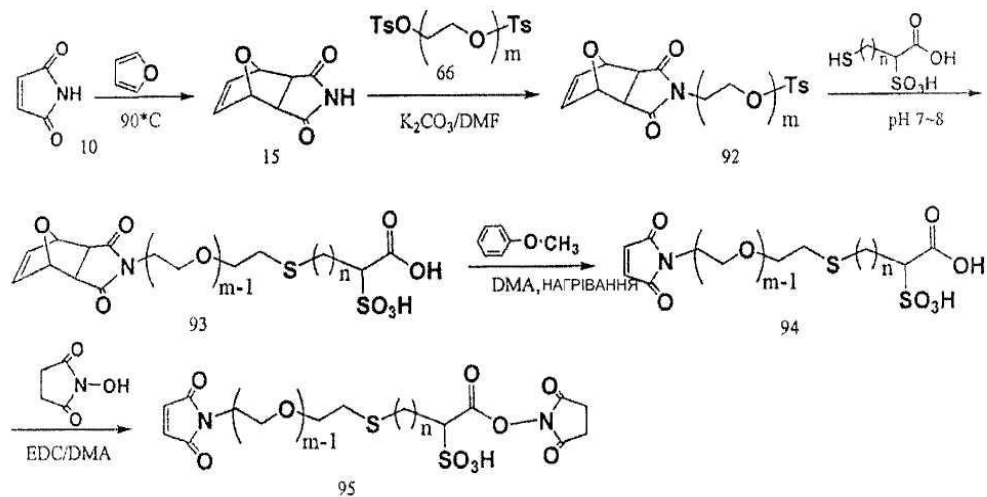


Fig. 21

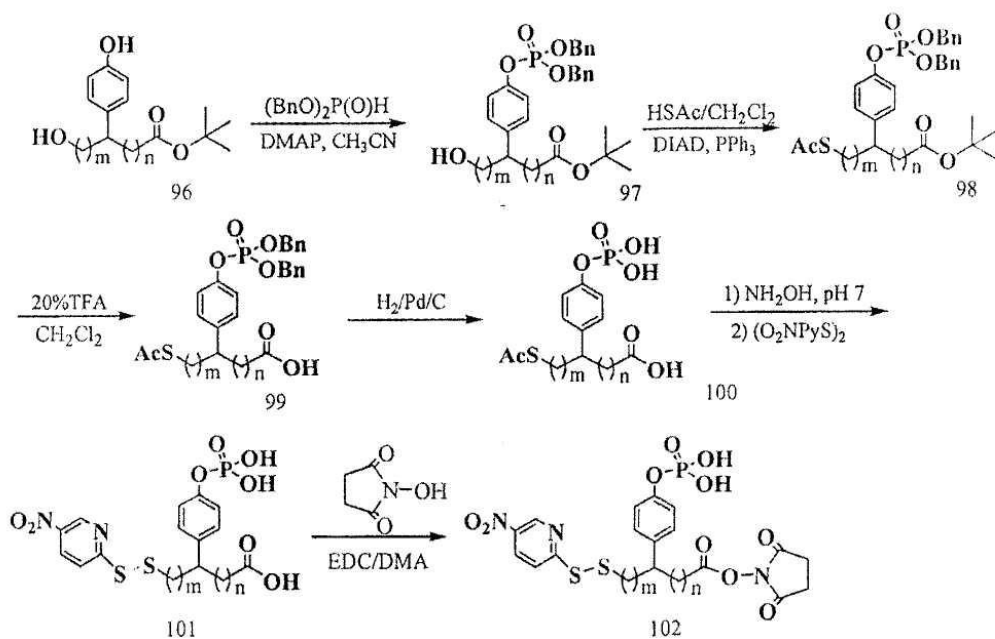
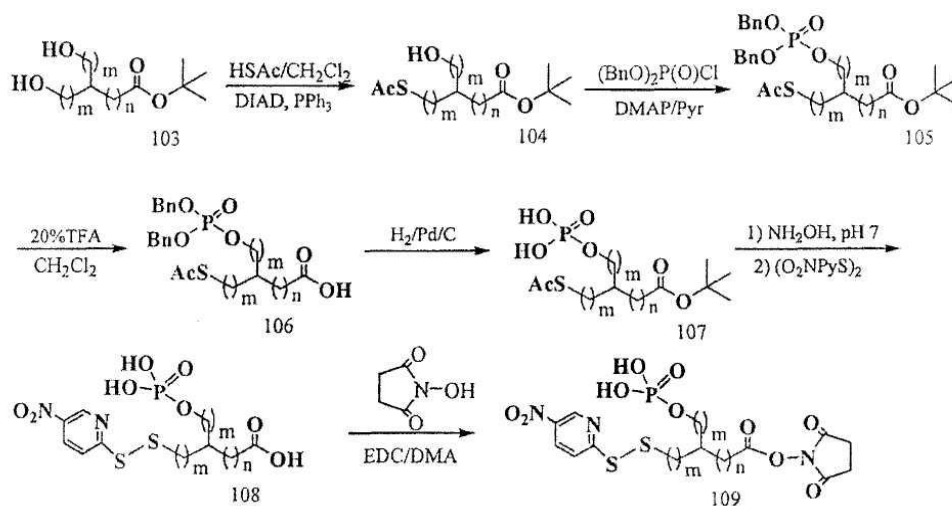
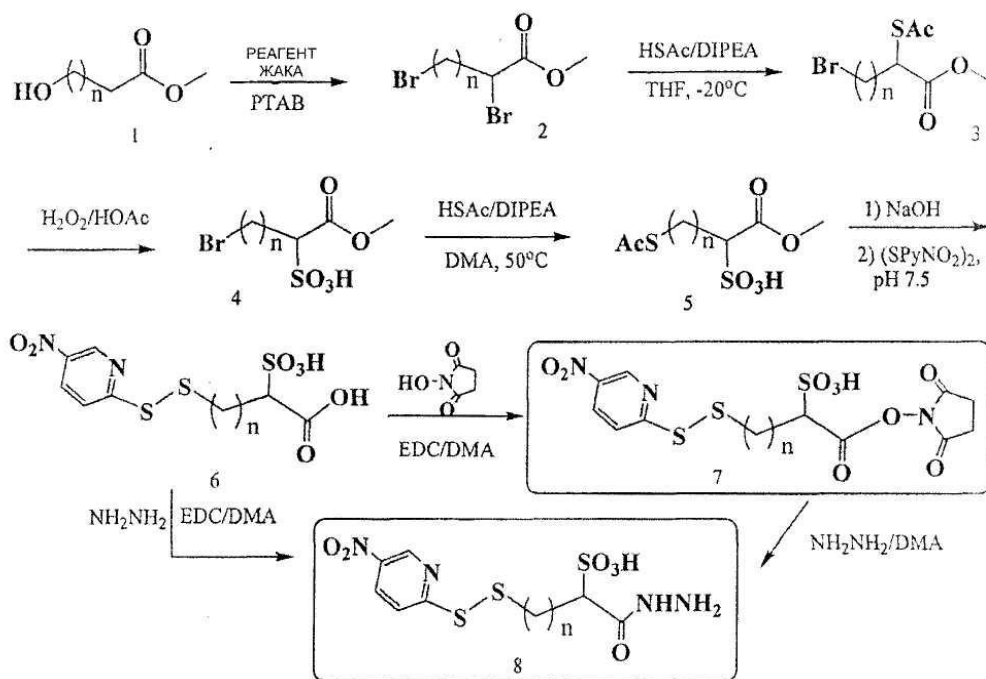


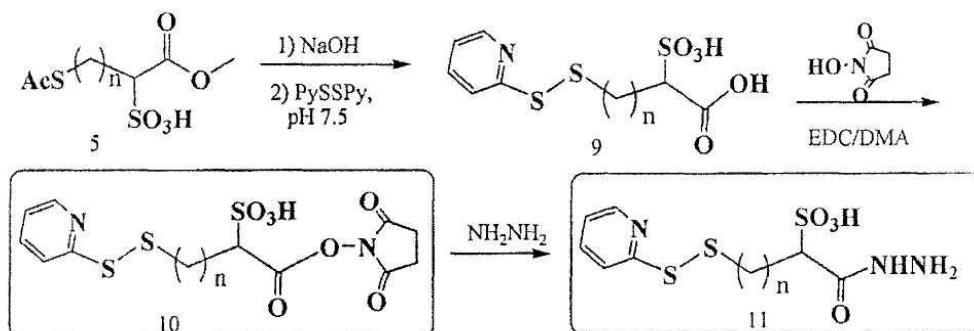
Fig. 22



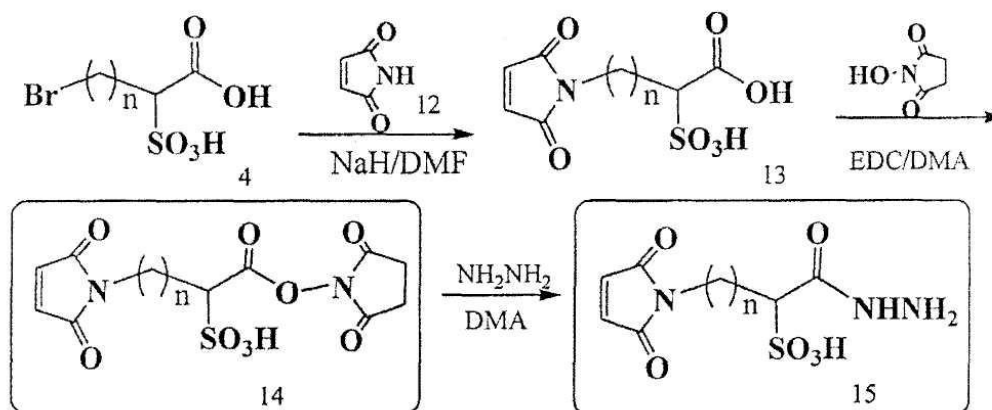
Фиг. 23



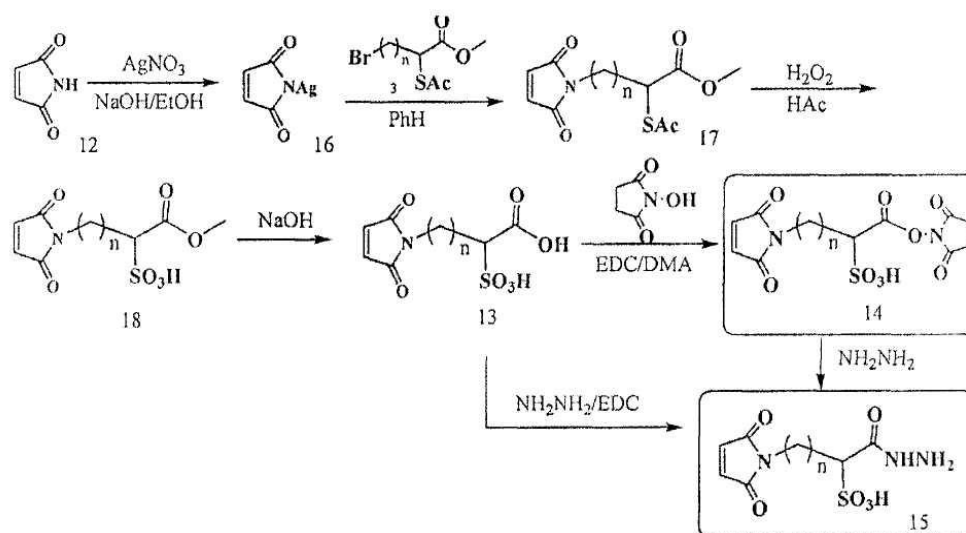
Фиг. 24



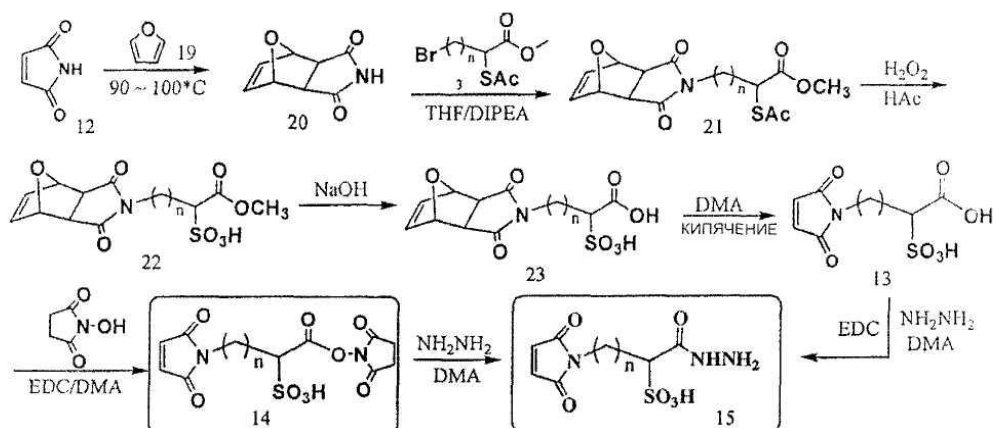
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

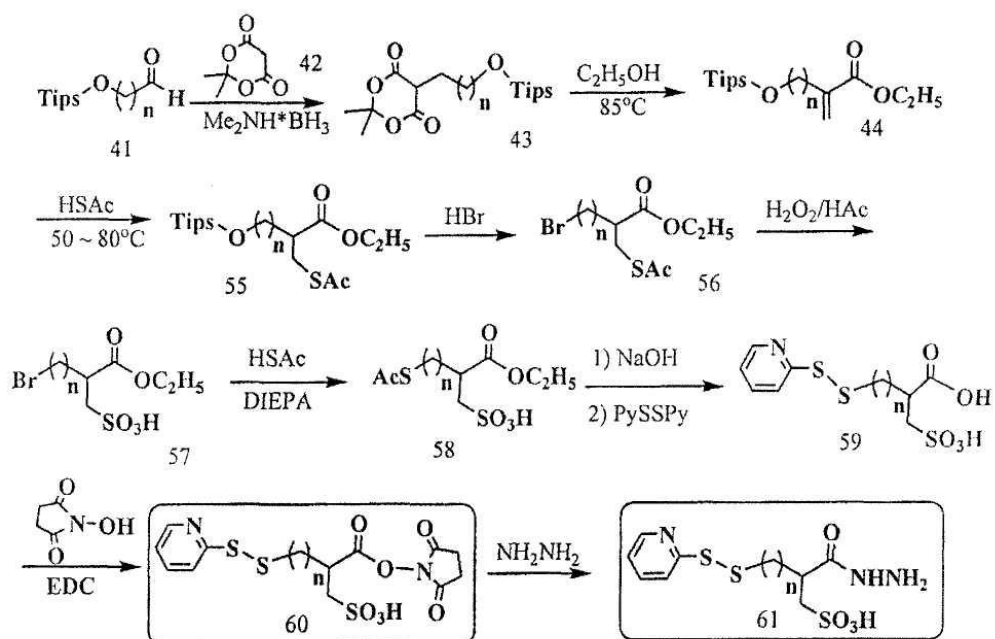


Fig. 29

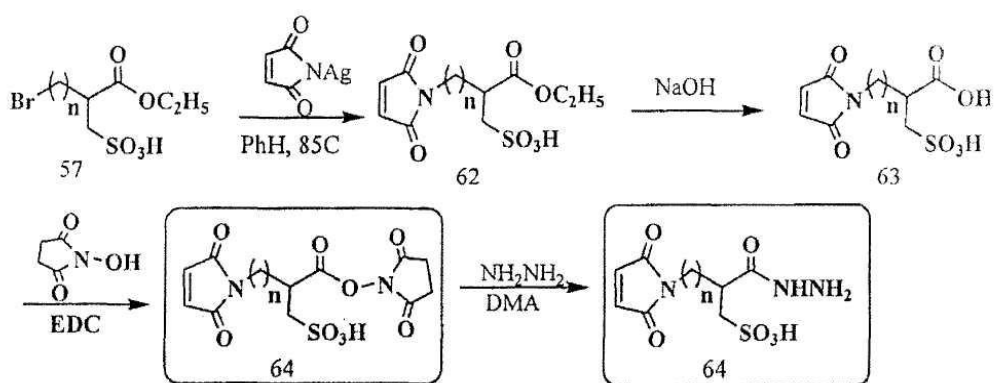


Fig. 30

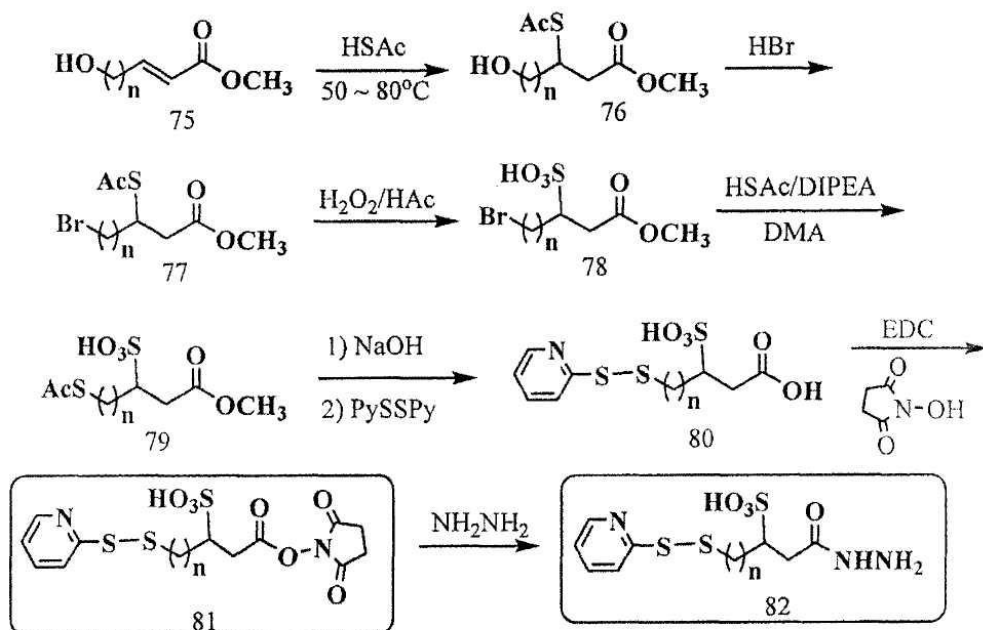


Fig. 31

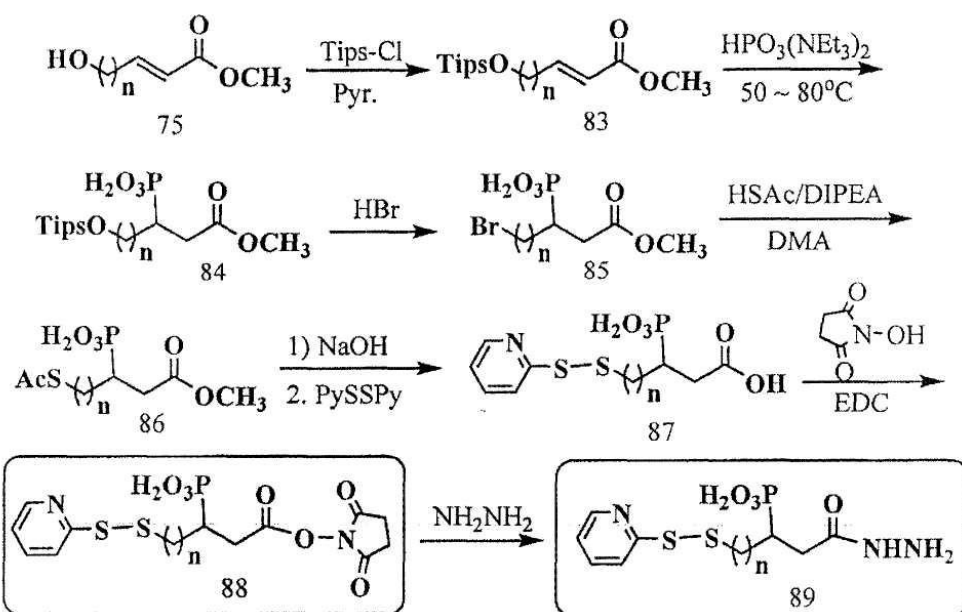
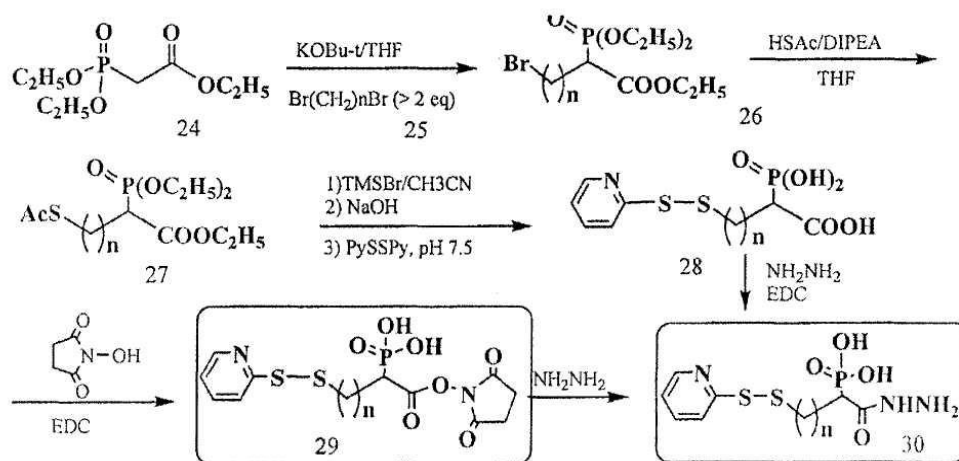
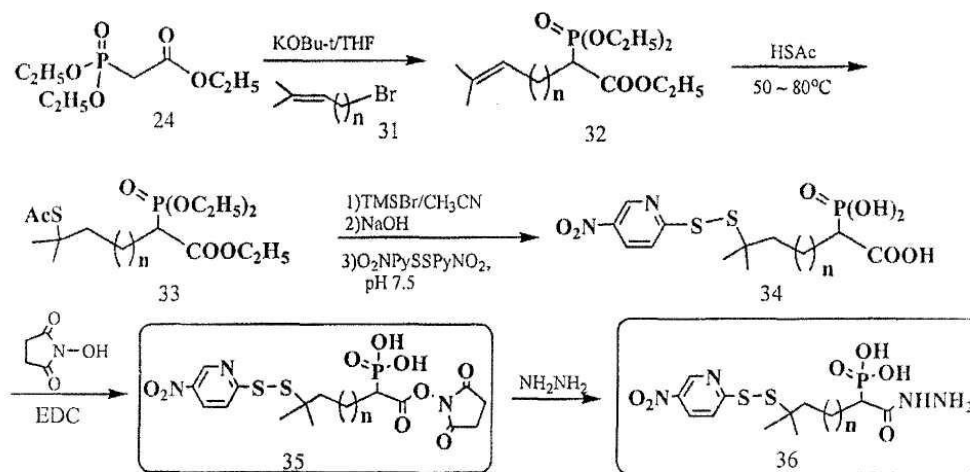


Fig. 32



Фиг. 33



Фиг. 34

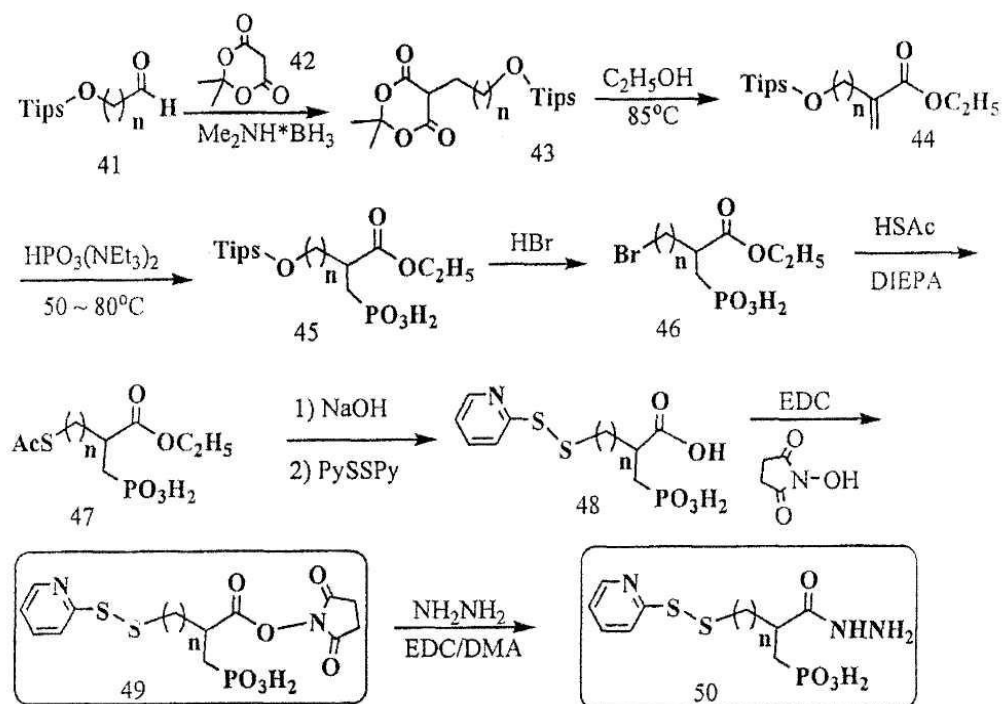


Fig. 35

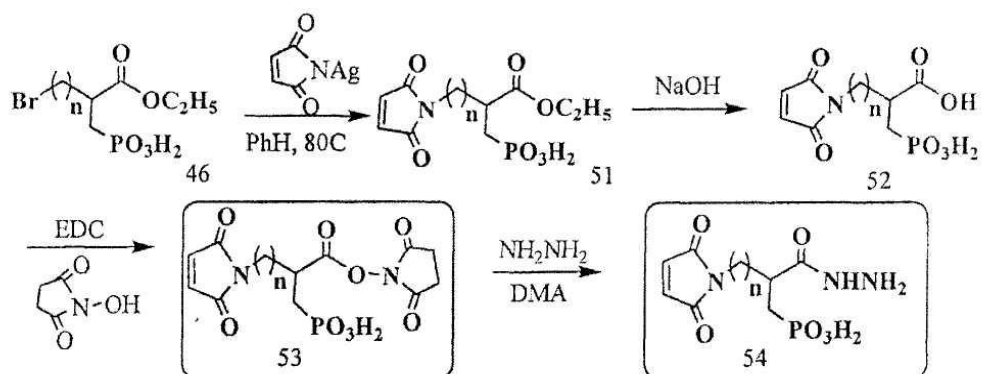


Fig. 36

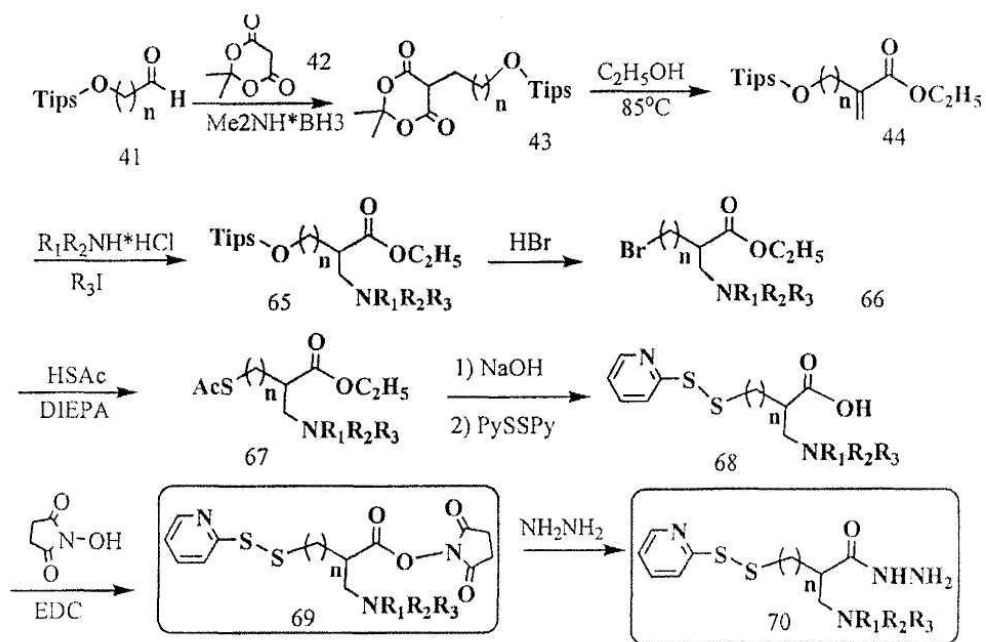


Fig. 37

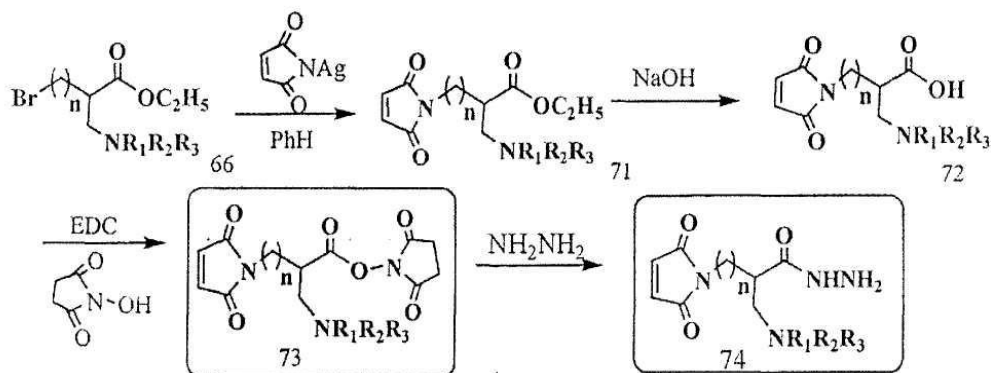


Fig. 38



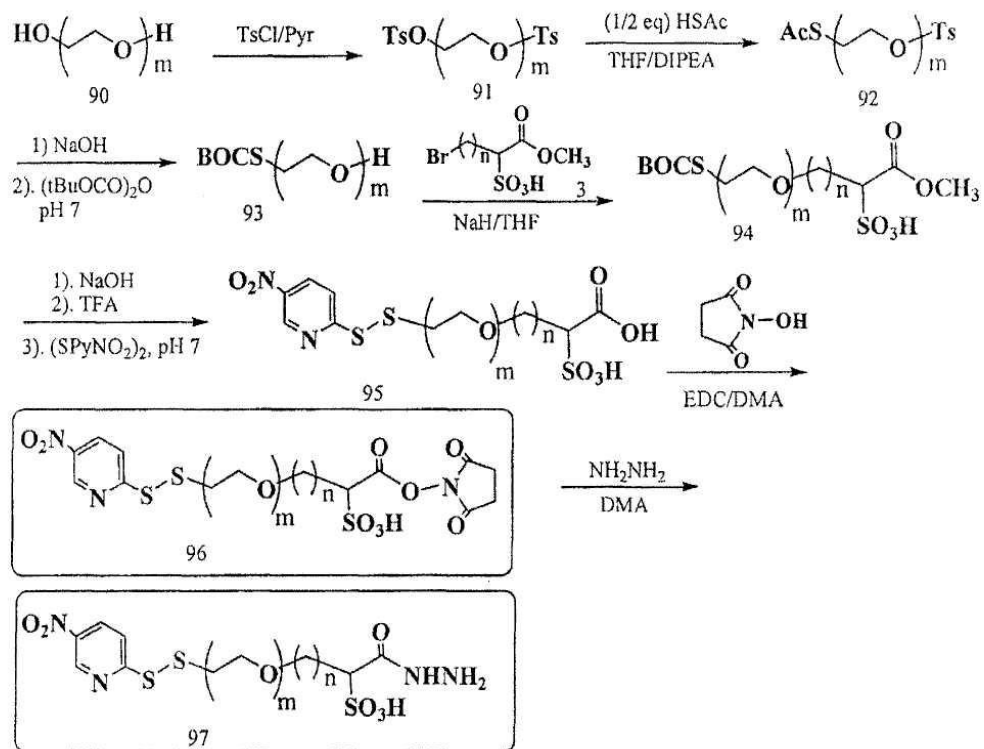


Fig. 39

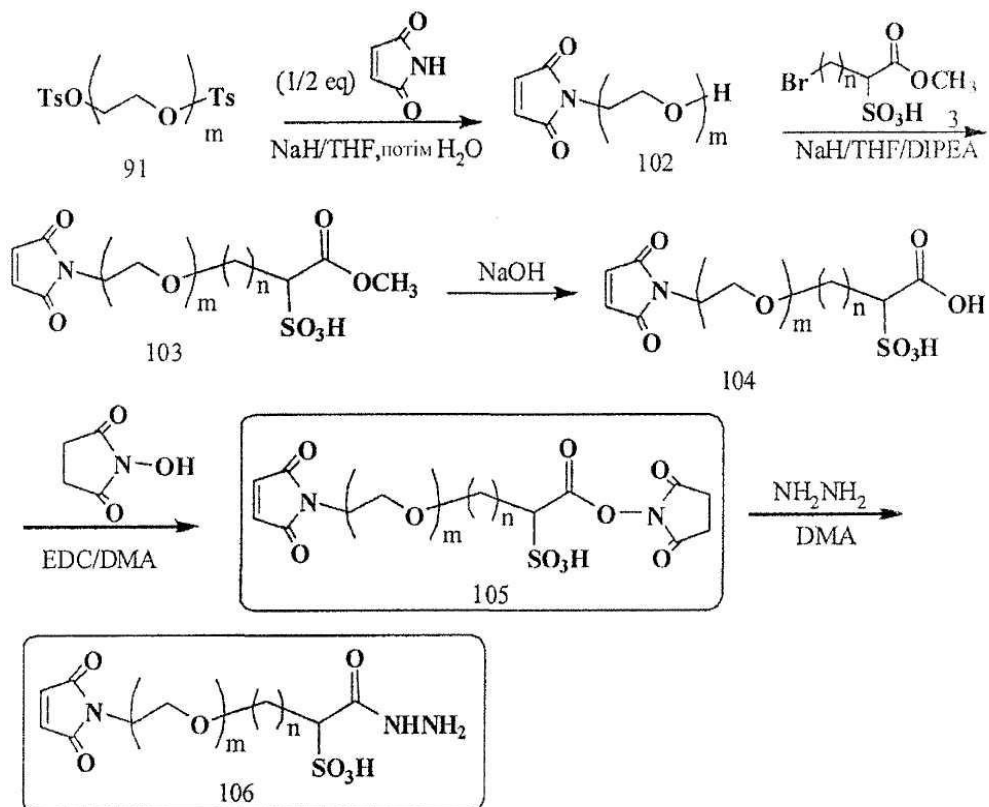
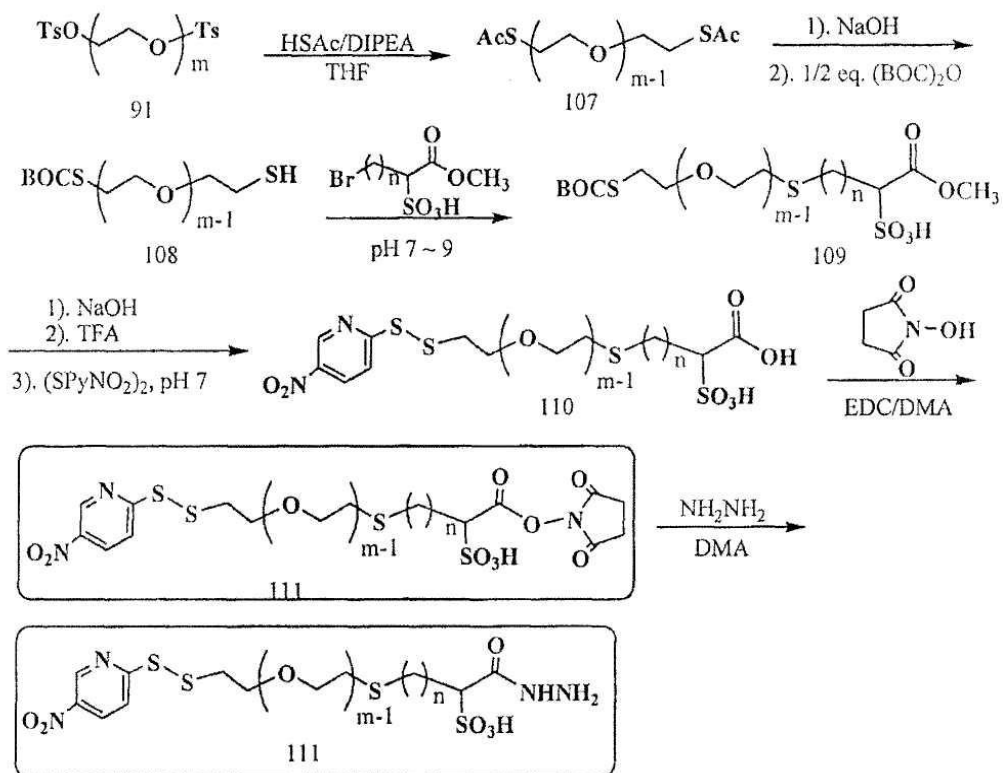
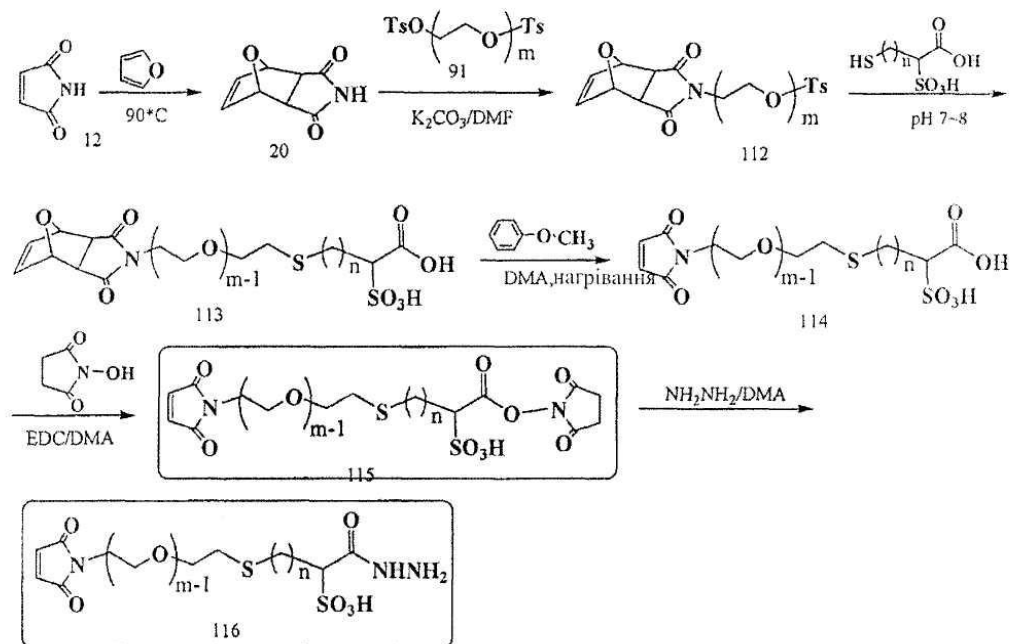


Fig. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

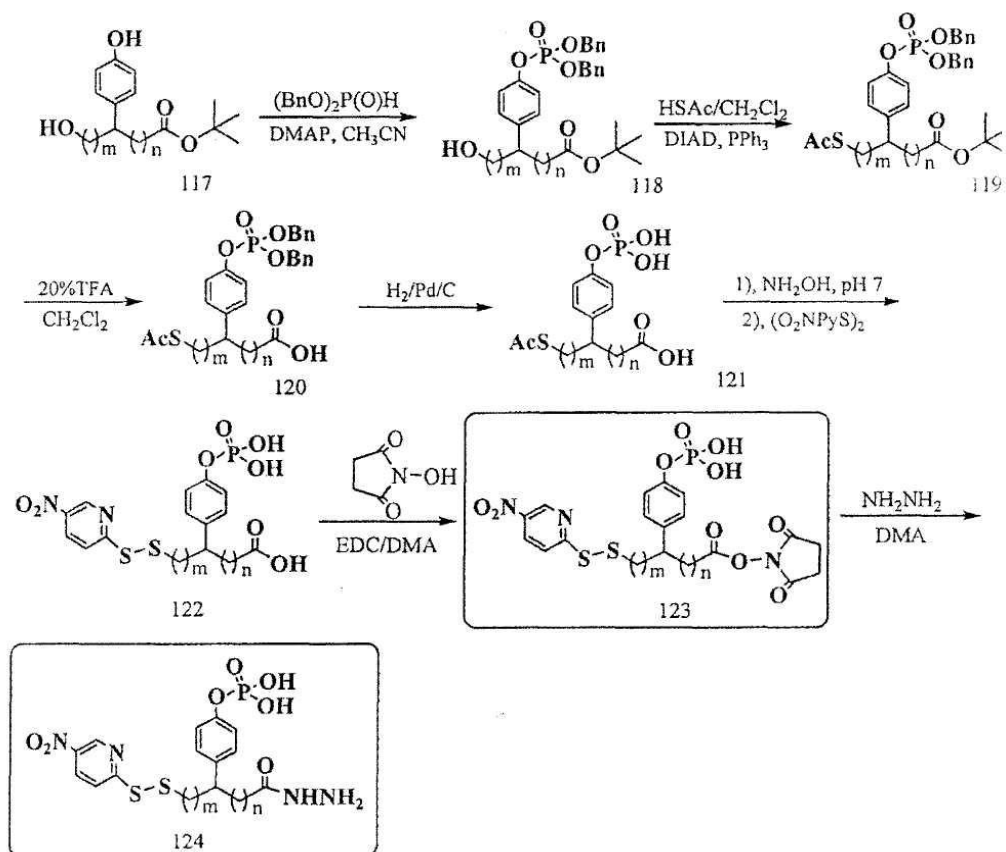


Fig. 43

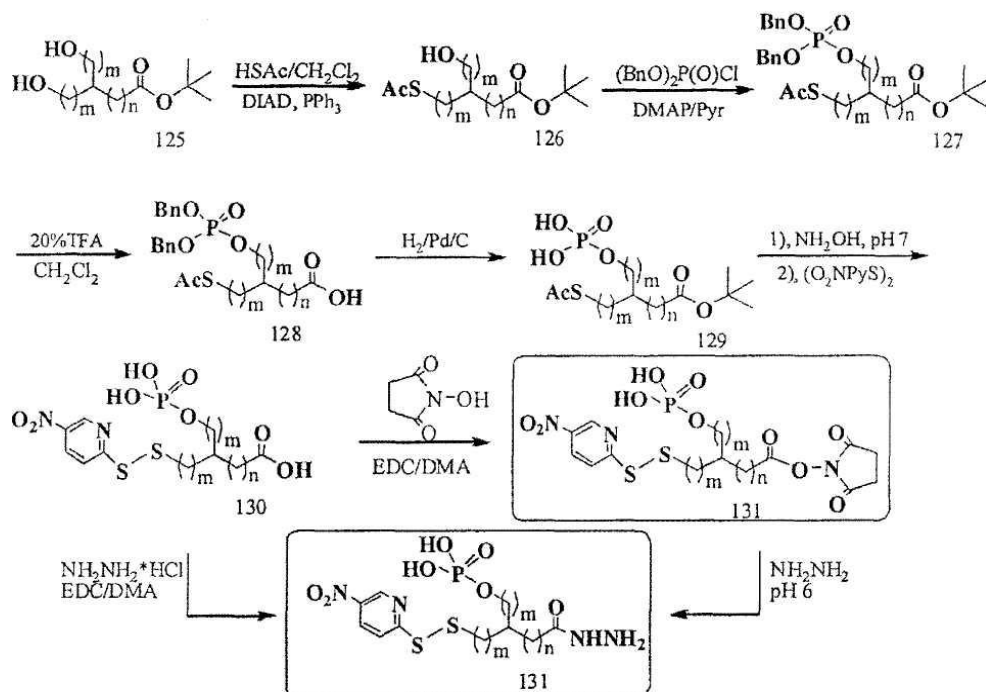


Fig. 44

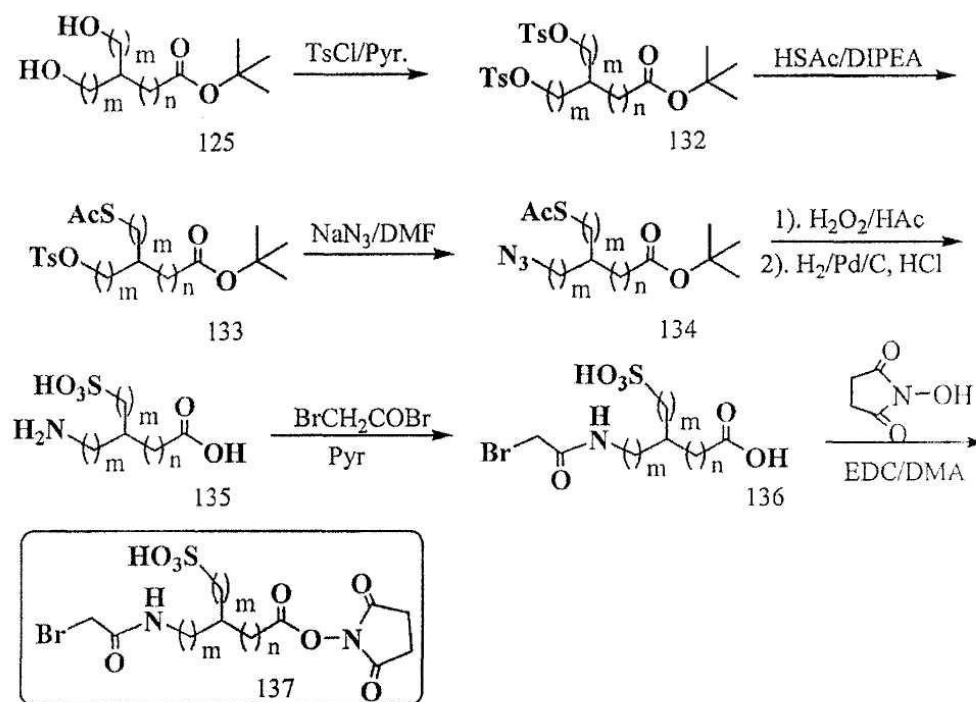


Fig. 45

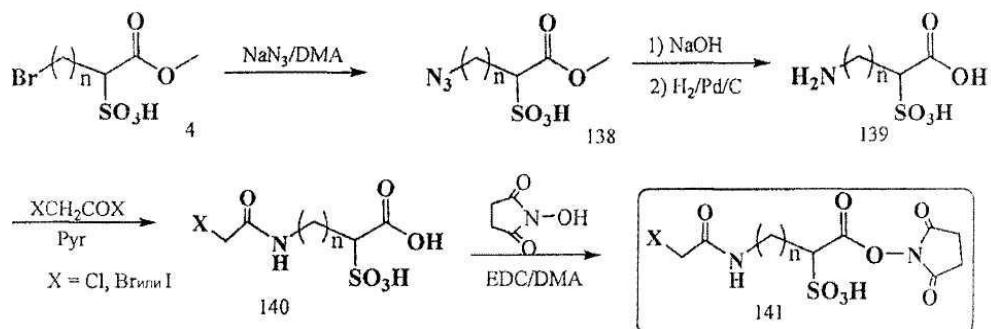
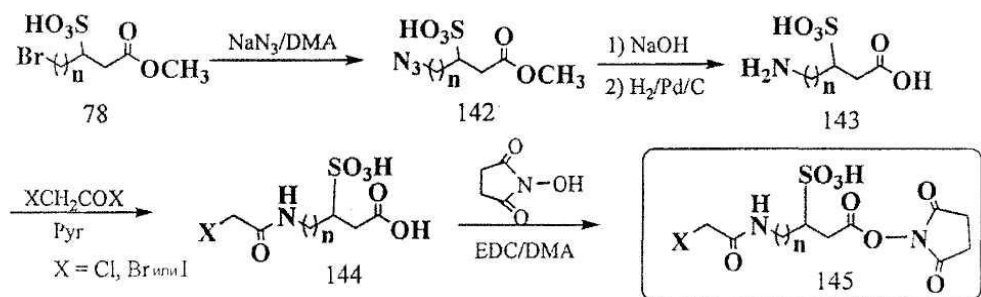
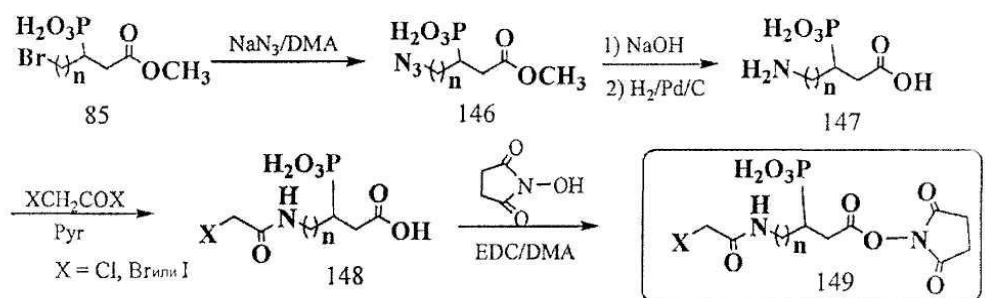


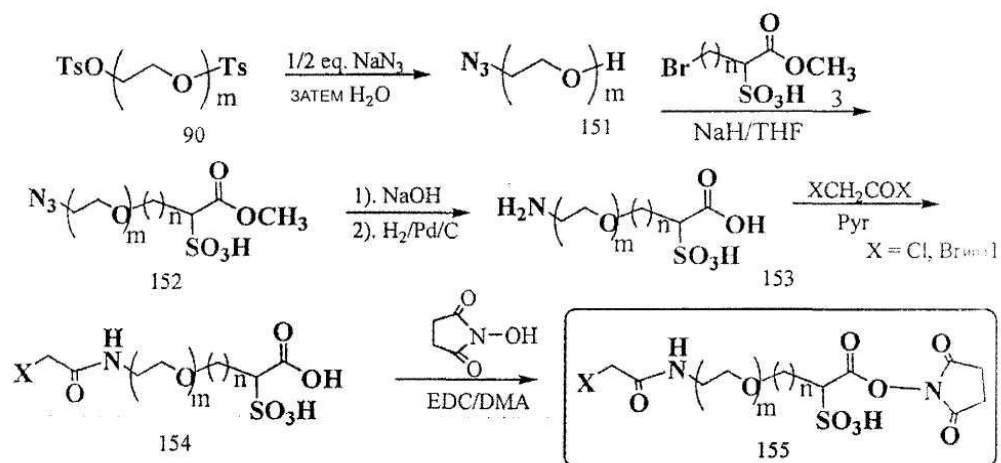
Fig. 46



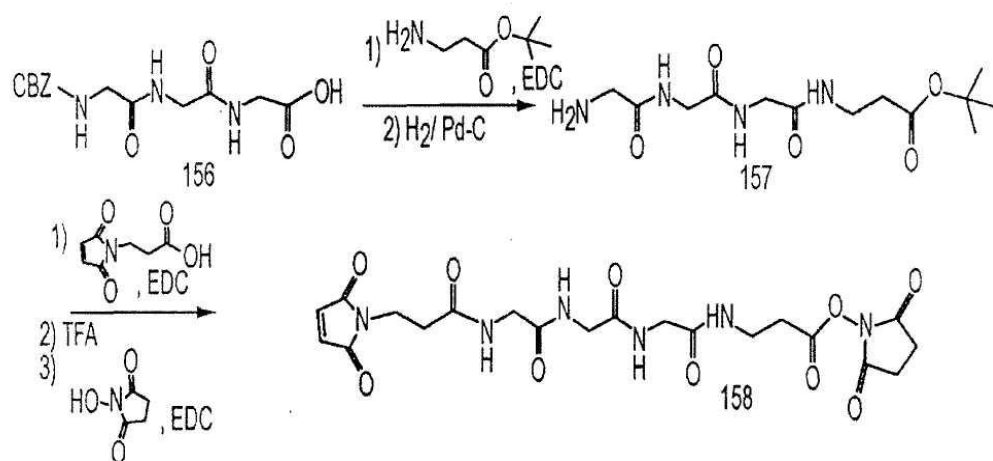
Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 51

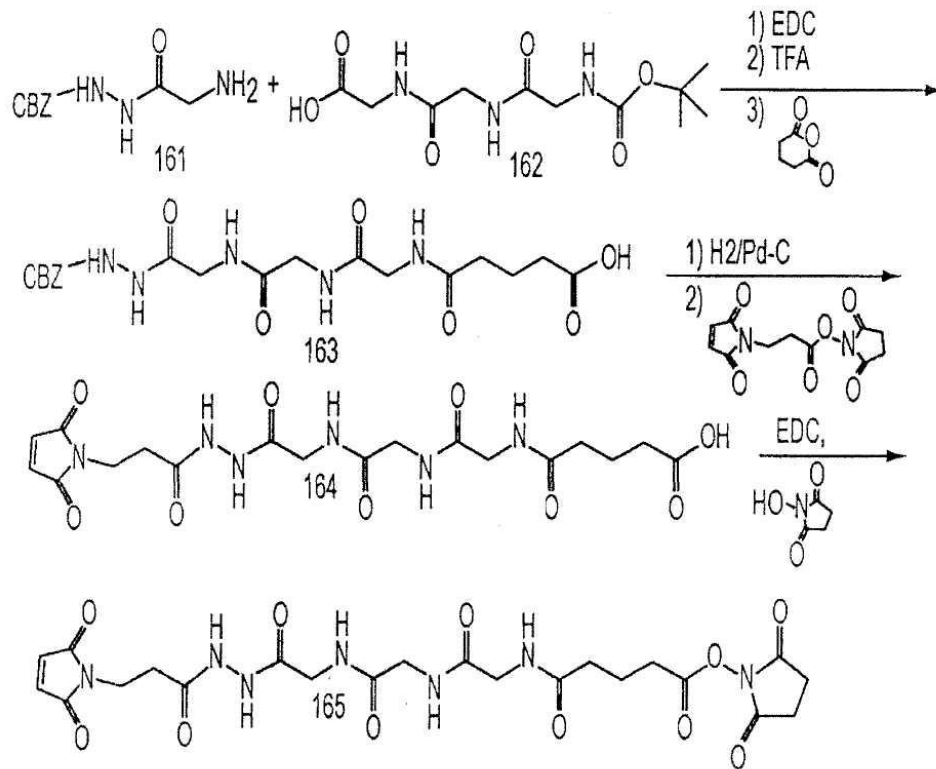


Fig. 52

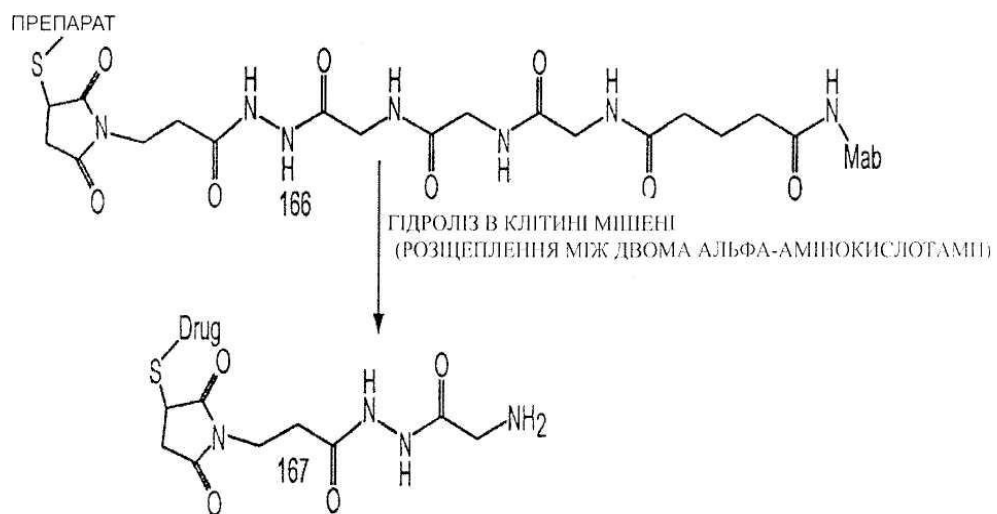


Fig. 53

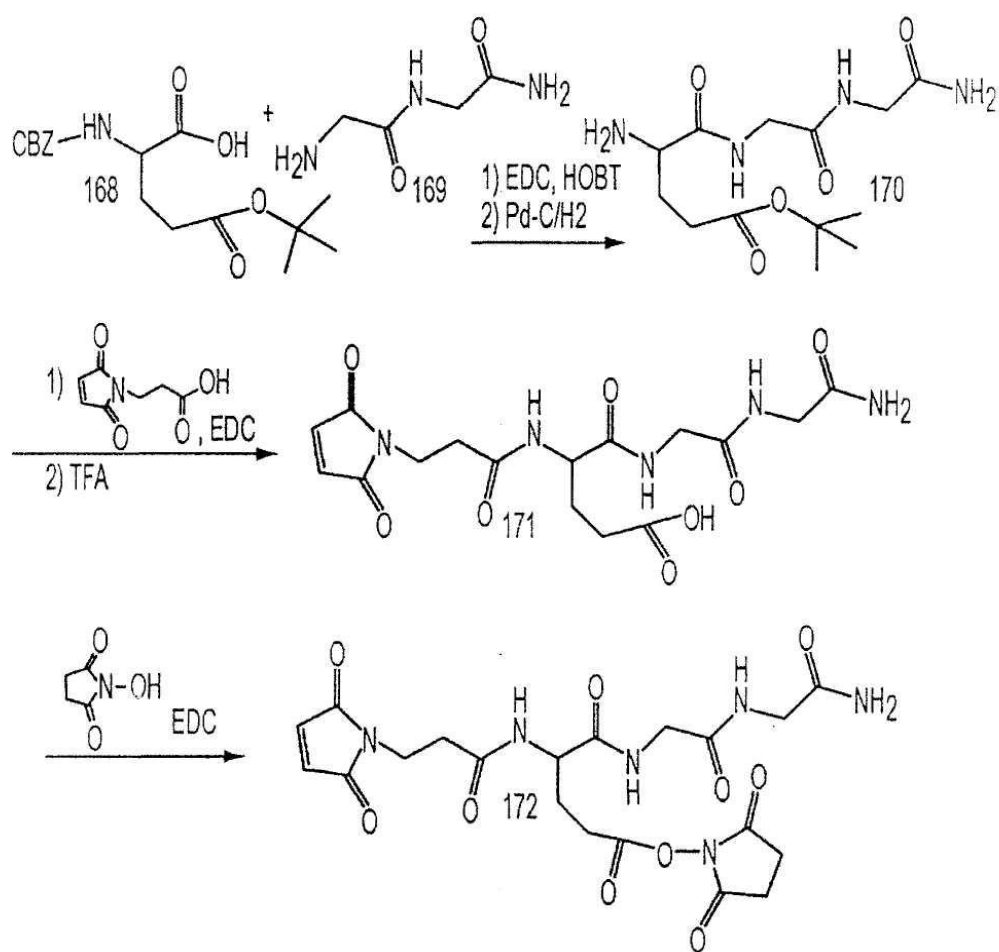
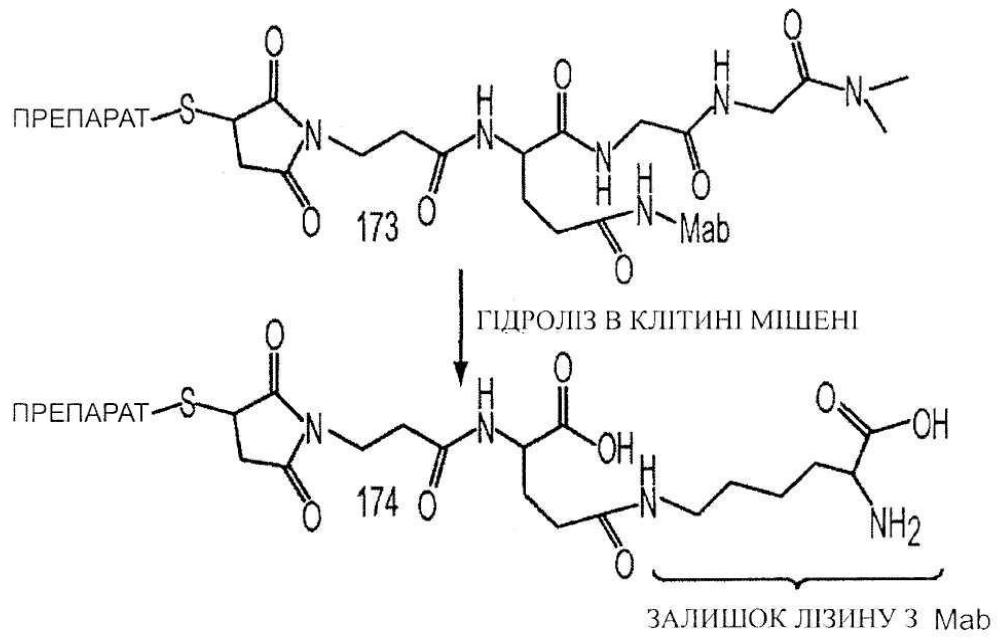


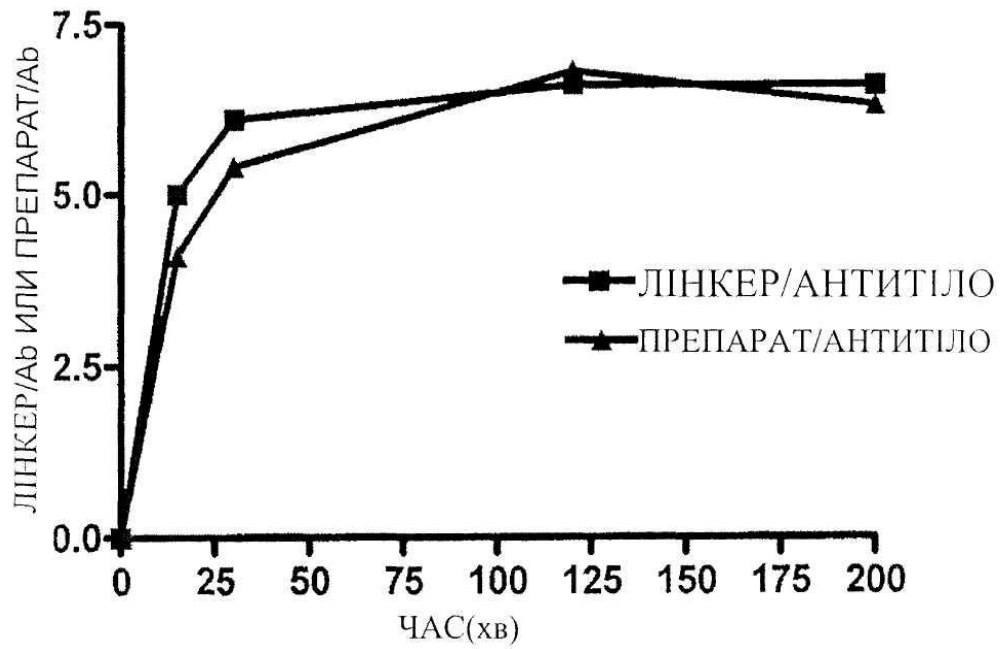
Fig. 54





Фіг. 55

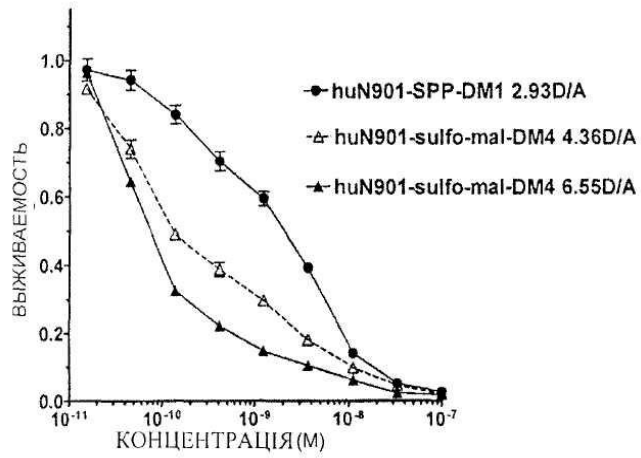
C242-DM4, СУЛЬФОЛІНКЕР НОСІЙ



Фіг. 56

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАНТІВ АНТИ-CD56 (huN901) - МАЙТАНСИНОЇД

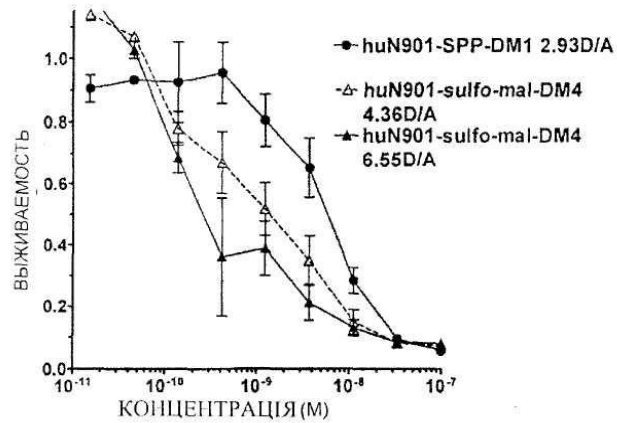
МОРР-8 КЛЕТКИ



Фіг. 57А

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАНТІВ АНТИ-CD56 (huN901) - МАЙТАНСИНОЇД

РН-30



Фіг. 57В

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАНТІВ АНТИ-CD56 (huN901) - МАЙТАНСИНОЇД

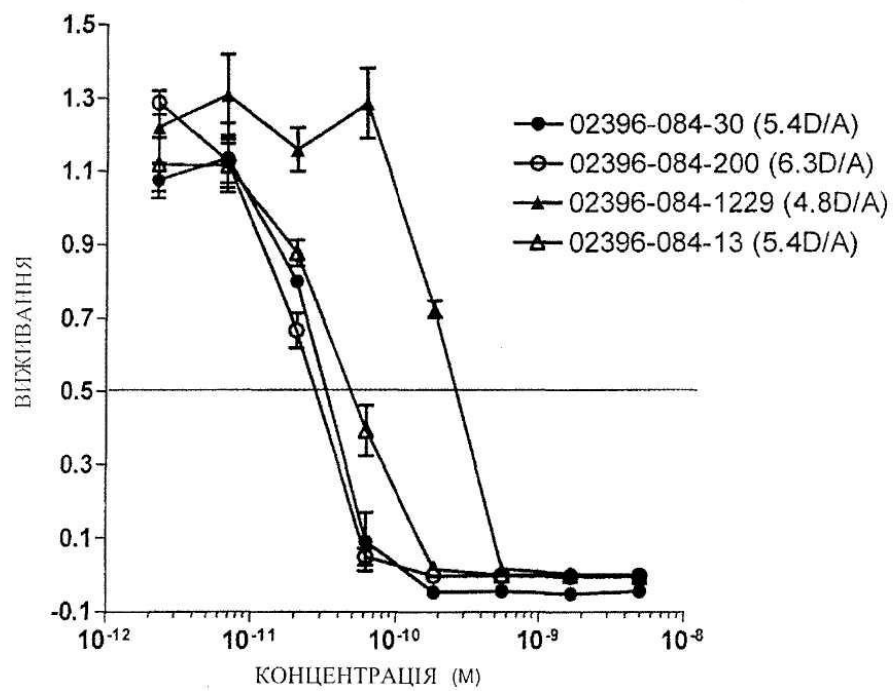
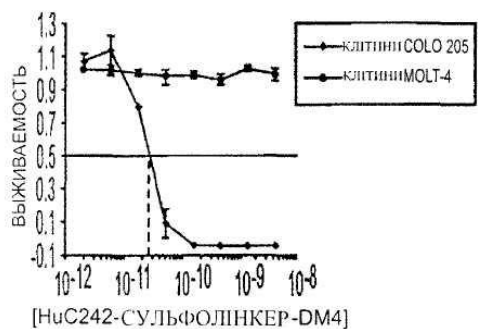


Fig.57C

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ: huC242 - СУЛЬФОЛІНКЕР - DM4 (5,4 D/A)  
НА КЛІТИНАХ COLO 205 И MOLT-4

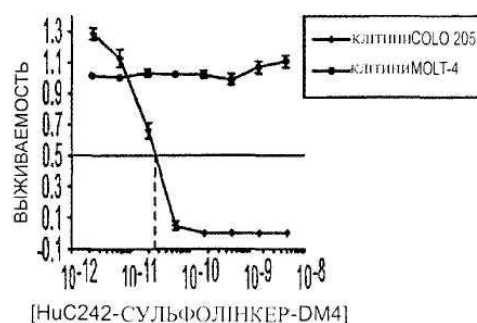


[HuC242-СУЛЬФОЛІНКЕР-DM4]

ЗНАЧЕННЯ  $\sim IC_{50}$

КЛІТИНИ COLO 205	$3.3e-11 M$
КЛІТИНИ MOLT-4	$>6.0e-9 M$

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ: huC242 - СУЛЬФОЛІНКЕР - DM4 (6,3 D/A)  
НА КЛІТИНАХ COLO 205 И MOLT-4

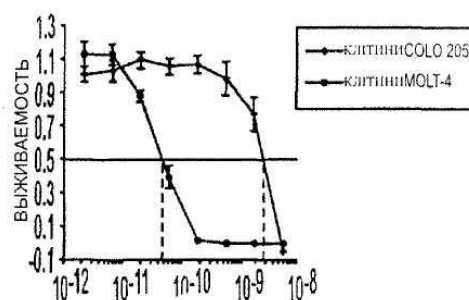


[HuC242-СУЛЬФОЛІНКЕР-DM4]

ЗНАЧЕННЯ  $\sim IC_{50}$

КЛІТИНИ COLO 205	$2.9e-11 M$
КЛІТИНИ MOLT-4	$>6.0e-9 M$

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ: huC242 - СУЛЬФОЛІНКЕР - DM1 (5,4 D/A)  
НА КЛІТИНАХ COLO 205 И MOLT-4



[HuC242-СУЛЬФОЛІНКЕР-DM1], M

ЗНАЧЕННЯ  $\sim IC_{50}$

КЛІТИНИ COLO 205	$4.8e-11 M$
КЛІТИНИ MOLT-4	$2.3e-9 M$

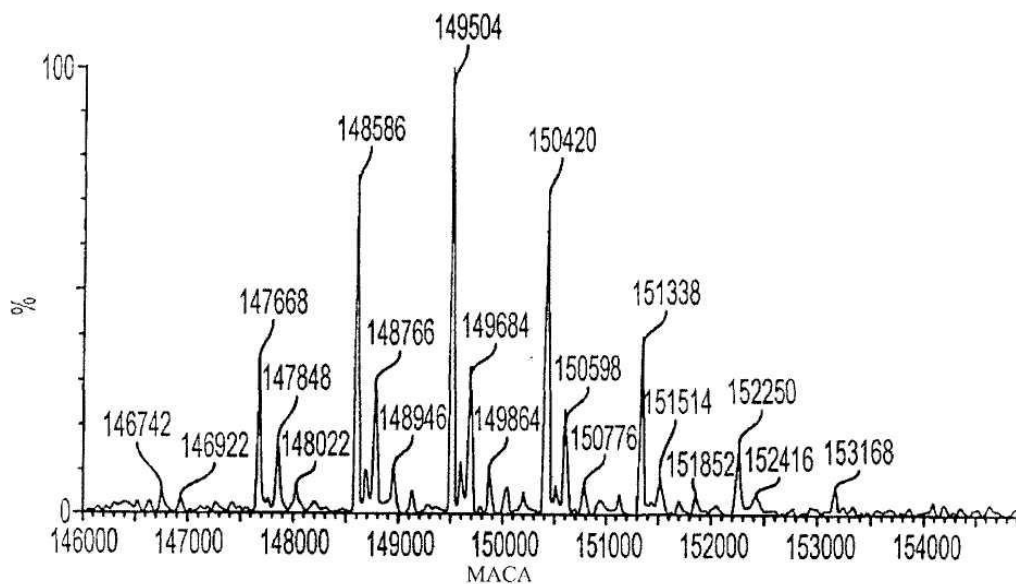
Fig. 58

## МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ КОН'ЮГАТА huC242-СУЛЬФОЛІНКЕР-DM1

ДЕГЛІКОЗІЛОВАНИЙ C242-SPDB(SO<sub>3</sub>)-DM1 (DAPENG)

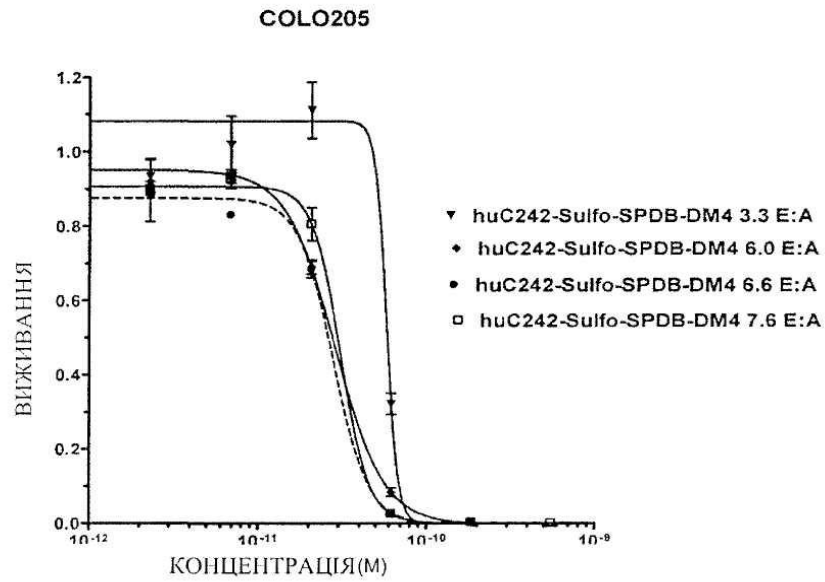
ACL\_010507\_SEC\_C242\_SPDB\_DM1\_3 35 (7.805) Sb (25, 10.00); M1 [Ev-96612,lt11]

(Gs, 1.700,2406:4000,2.00,L40,R40); Sb (25,10.00); Cm (31:49) 1: TOF MS ES+3.72e3



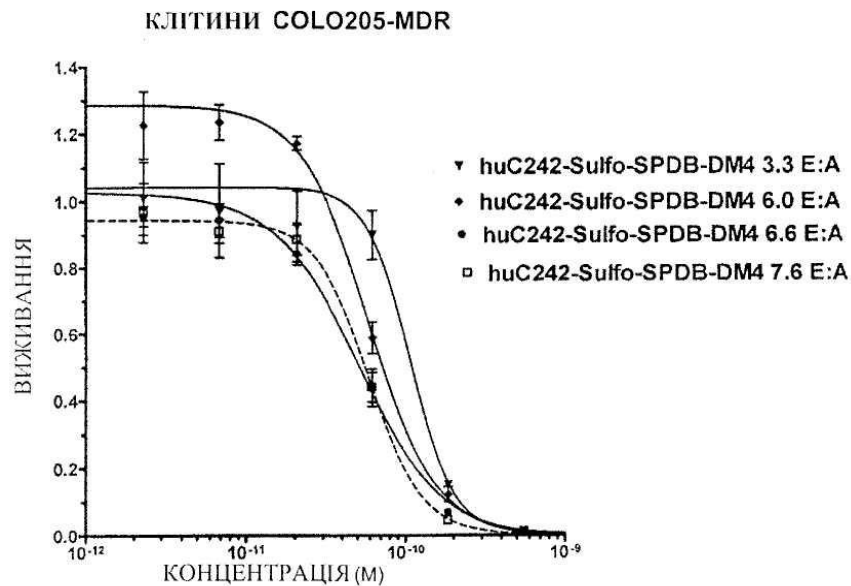
Фиг. 59

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-CanAg (huC242)-СУЛЬФОЛІНКЕР-МАЙТАНСИНОЇД ПРИ ЗРОСТАННІ  
НАВАНТАЖЕННЯ МАЙТАНСИНОЇДІВ (E:A) НА КЛІТИНАХ COLO205



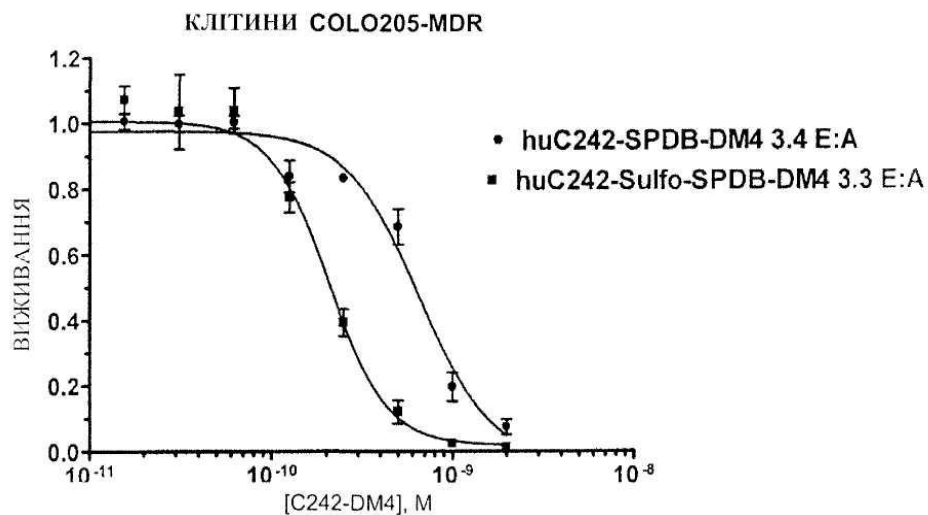
Фіг. 60

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-CanAg (huC242)-СУЛЬФОЛІНКЕР-МАЙТАНСИНОЇД ПРИ ЗРОСТАННІ  
НАВАНТАЖЕННЯ МАЙТАНСИНОЇДІВ (E:A) НА КЛІТИНАХ COLO205-MDR  
З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ЛІКІВ



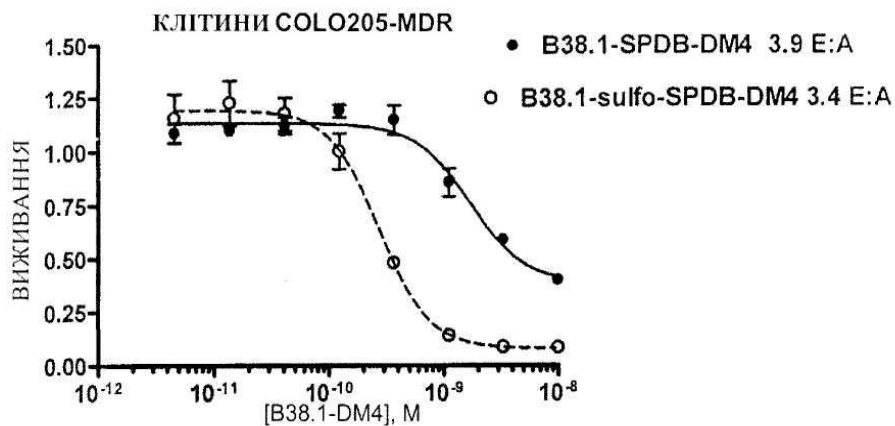
Фіг. 61

ЦИТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-CanAg (huC242)-МАЙТАНСИНОЇД З СУЛЬФОЛІНКЕРОМ АБО БЕЗ НЬОГО  
НА КЛІТИНАХ COLO205-MDR  
З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ЛІКІВ



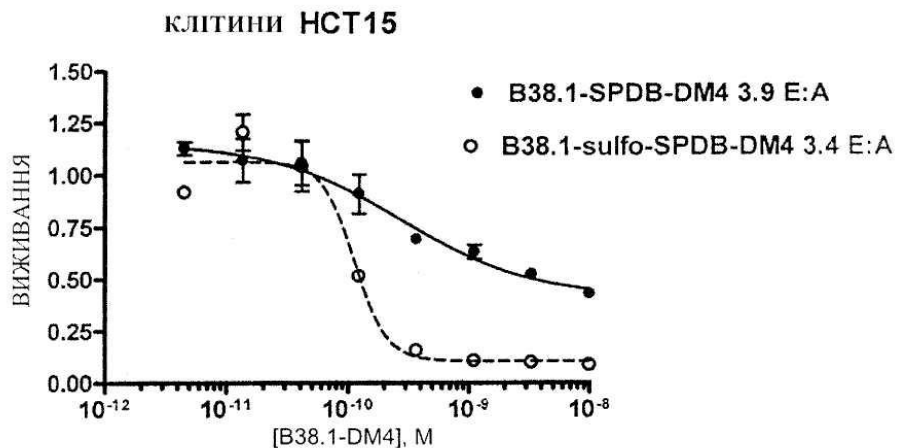
Фіг. 62

ЦИТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-ЕрСАМ (B38.1)-МАЙТАНСИНОЇД З СУЛЬФОЛІНКЕРОМ АБО БЕЗ НЬОГО  
НА КЛІТИНАХ COLO205-MDR  
З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ЛІКІВ



Фіг. 63

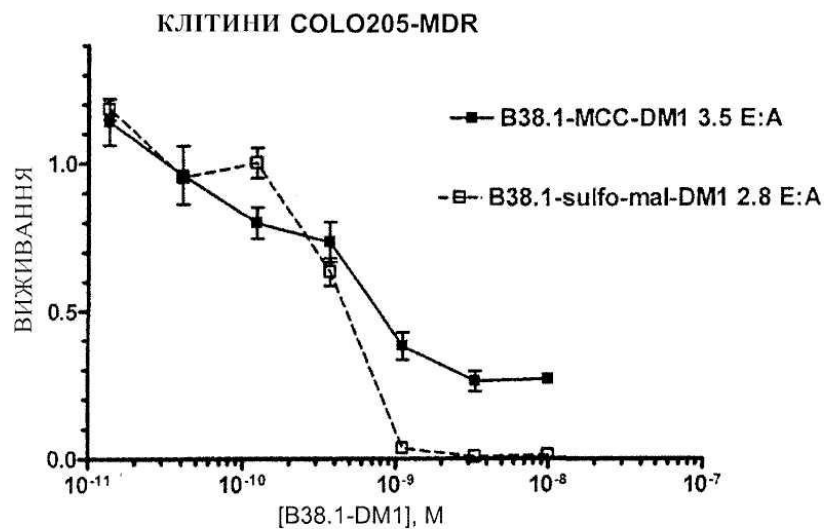
ЦИТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-ЕрСАМ (B38.1)-МАЙТАНСИНОЇД З СУЛЬФОЛІНКЕРОМ АБО БЕЗ НЬОГО  
НА КЛІТИНАХ HCT15  
З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ЛІКІВ



Фіг. 64

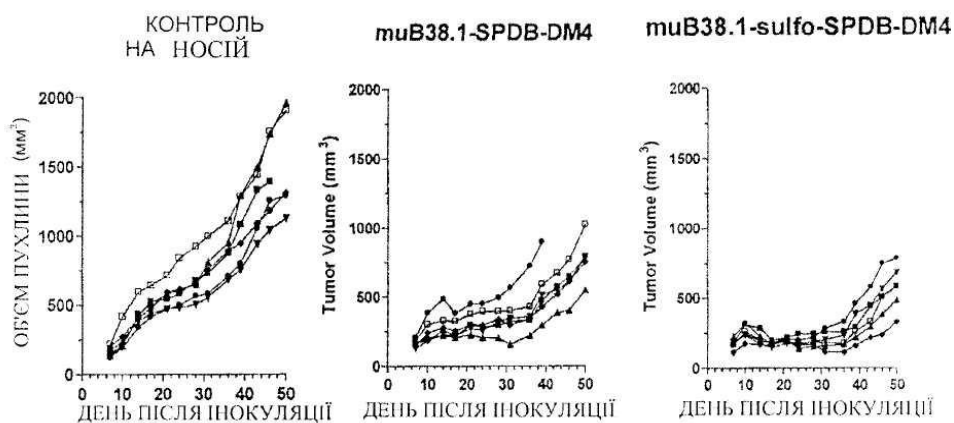


ЦИТОКСИЧНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-ЕрСАМ (B38.1)-МАЙТАНСИНОЇД З СУЛЬФОЛІНКЕРОМ АБО БЕЗ НЬОГО  
НА КЛІТИНАХ COLO205-MDR  
З МНОЖИННОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ЛІКІВ

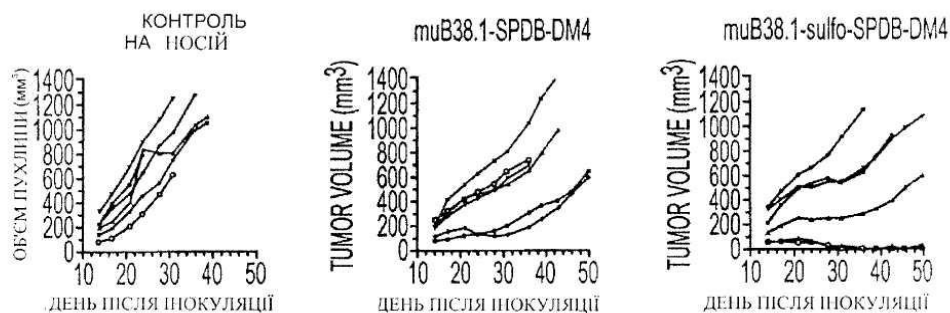


Фіг. 65

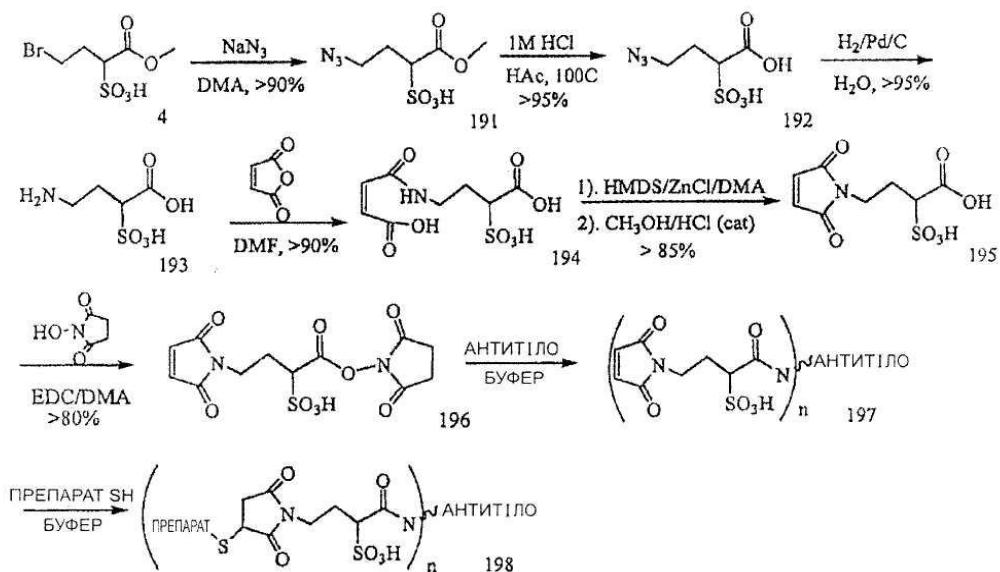
ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ in vivo КОН'ЮГАТІВ  
АНТИ-ЕрСАМ (B38.1)-МАЙТАНСИНОЇД  
НА КСЕНОТРАНСПЛАНТАТИ COLO205 *mdr* (ІНДИВІДУАЛЬНІ ПУХЛИНИ)



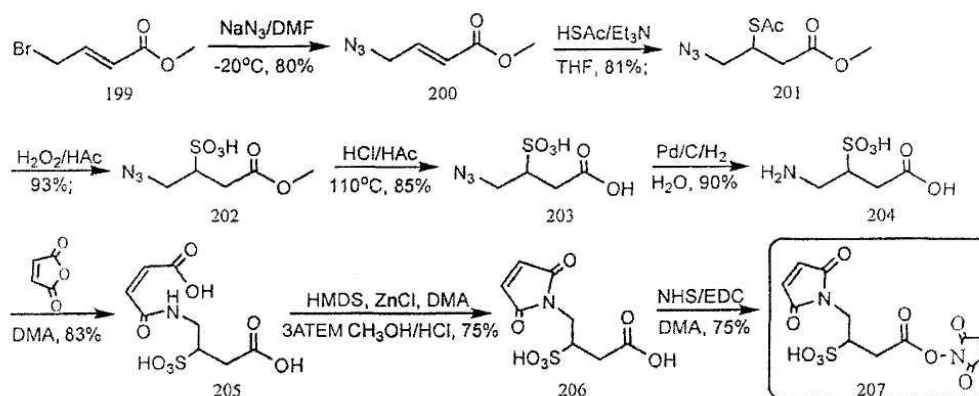
Фіг. 66



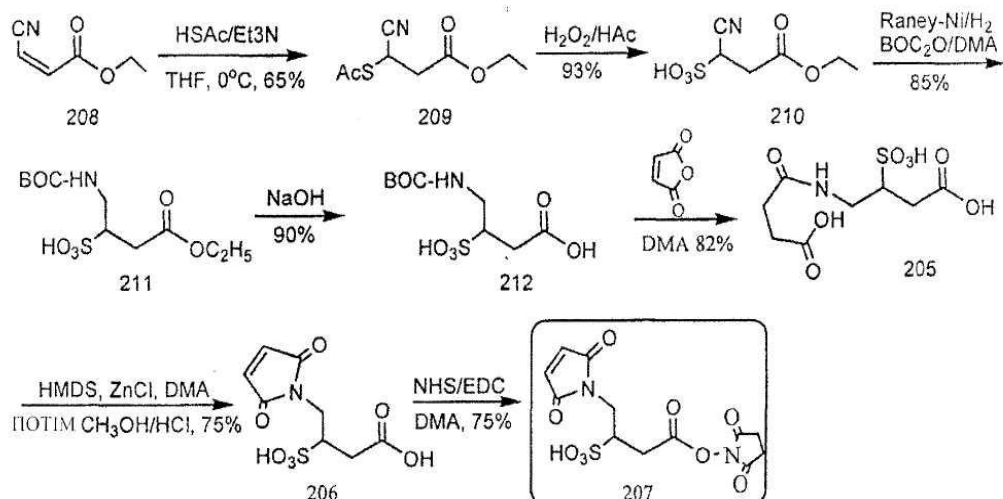
Фіг. 67



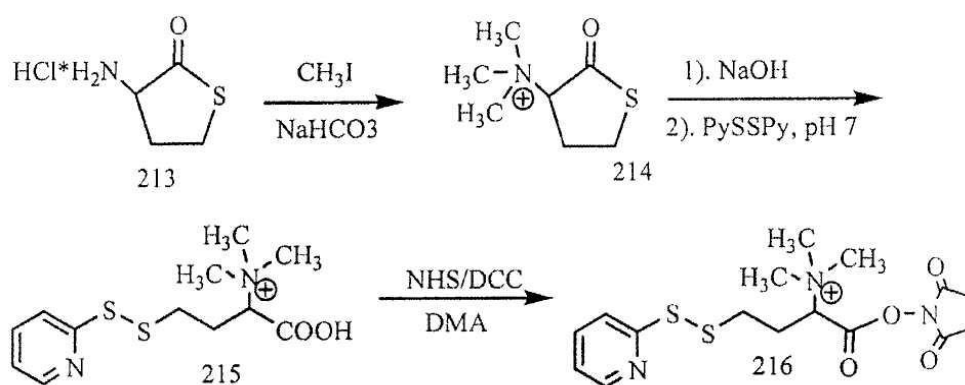
Фіг. 68



Фіг. 69



Фіг. 70

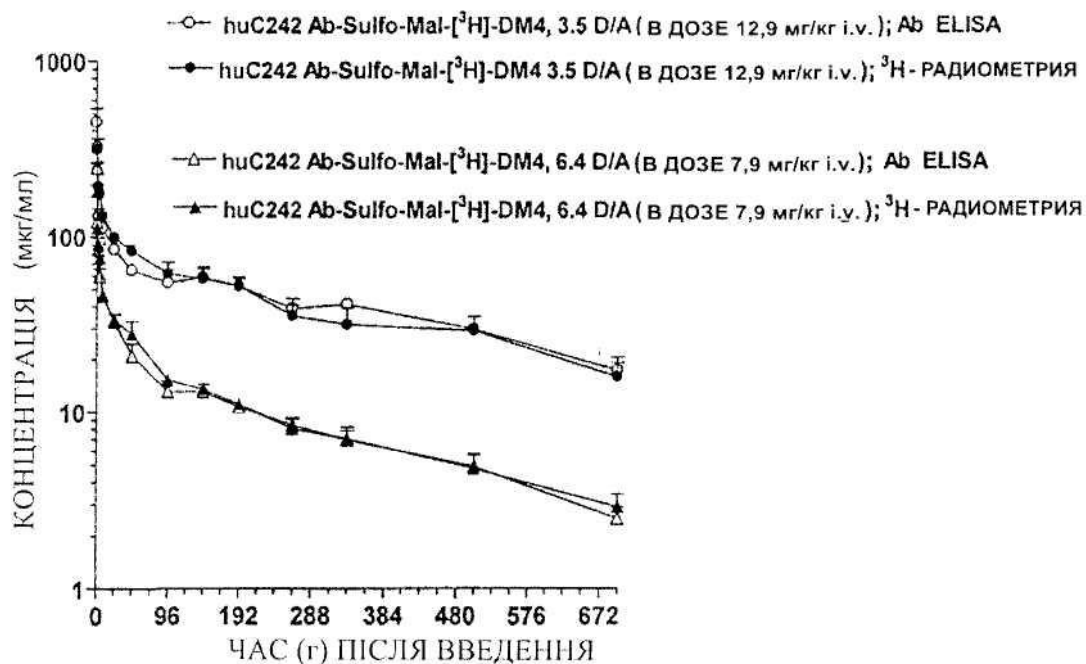


Фіг. 71

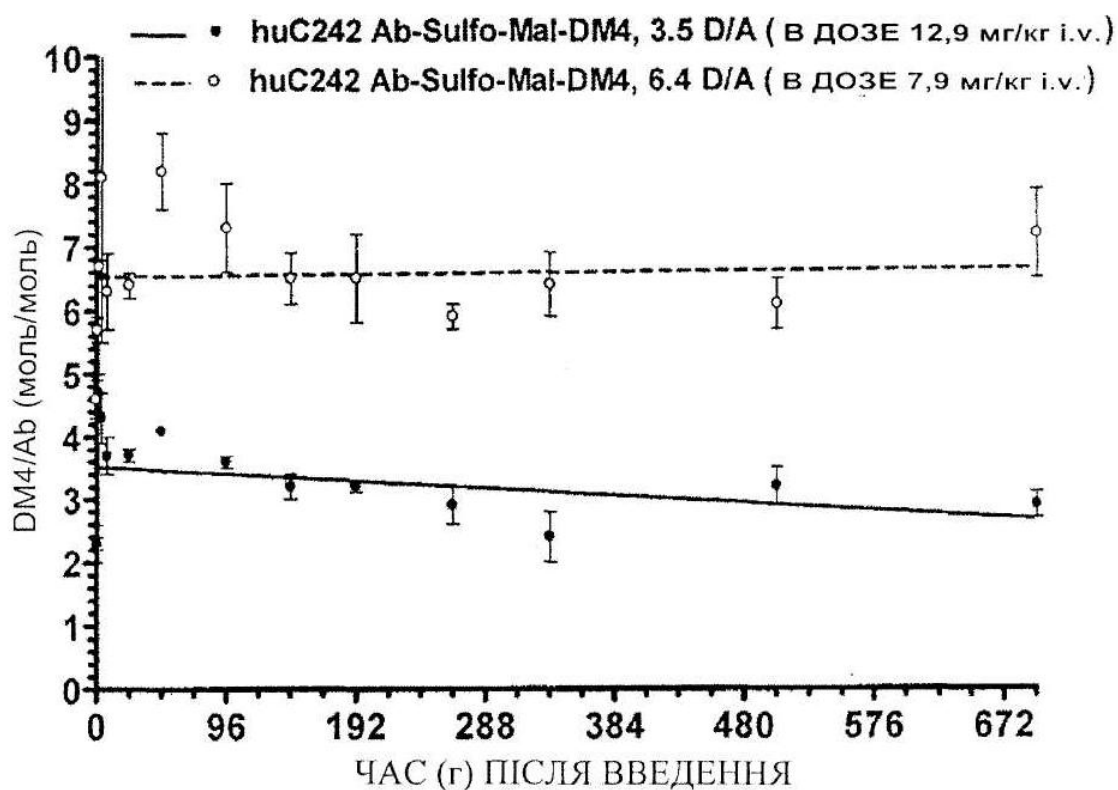
ФАРМАКОКІНЕТИКА КОН'ЮГАТІВ АНТИТІЛО huC242-СУЛЬФО-Mal-[ $^3\text{H}$ -МІЧЕНИЙ]-DM4 ПРИ 3,5 И 6,4 DM4/Ab, ПРИ ВВЕДЕННІ В ДОЗАХ 12,9 И 7,9 мг/кг (i.v.), ВІДПОВІДНО В ПЛАЗМІ У ЩУРІВ CD-1.

**А.** КОНЦЕНТРАЦІЯ Ab (МЕТОДОМ ELISA АБО МЕТОДОМ  $^3\text{H}$ -РАДІОМЕТРІЇ) В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЧАСУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ. В СПІВВІДНОШЕННІ МАЙТАНСІНОЇД(DM4)/АНТИТІЛО (Ab) В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЧАСУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ

Фіг. 72А та 72В



Фіг. 72А



Фіг. 72В

---

Комп'ютерна верстка О. Рябко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601