



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114073** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 12836	(72) Винахідник(и): Ховард Філіп Уілсон (GB), Мастерсон Люк (GB), Тіберг'єн Арно (GB), Флайгер Джон А. (US), Ганзнер Дженет Л. (US), Полакис Пол (US), Полсон Ендрю (US), Рааб Хельга Е. (US), Спенсер С'юзен Д. (US)
(22) Дата подання заявки: 15.04.2011	(73) Власник(и): МЕДІММУНЕ ЛІМІТЕД, Milstein Building, Granta Park, Cambridge CB21 6GH, England (GB)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2017	(74) Представник: Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр. №177
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1006341.0, 1016802.9	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 0012507 A2, 09.03.2000 WO 2005023814 A1, 17.03.2005 EP 1813614 A1, 01.08.2007 EP 2019104 A1, 28.01.2009 KAMAL AHMED ET AL., "Development of pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepine beta-galactoside prodrugs for selective therapy of cancer by ADEPT and PMT", CHEMMEDCHEM (200805), vol. 3, no. 5, ISSN 1860-7179, pages 794-802
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.04.2010, 06.10.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB, GB	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.02.2013, Бюл.№ 4	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2017, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2011/032632, 15.04.2011	

(54) КОН'ЮГАТИ ПІРОЛБЕНЗОДІАЗЕПІНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**(57) Реферат:**

Описані кон'югати і сполуки для створення кон'югатів, які являють собою PBD-молекули, зв'язані через положення N10, а також застосування зазначених кон'югатів для лікування проліферативних захворювань, включаючи рак.

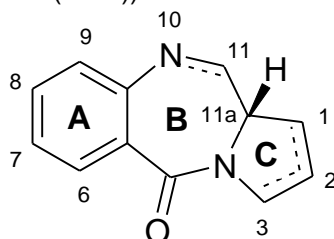
UA 114073 C2

Даний винахід відноситься до піролбензодіазепінів (PBD), зокрема піролбензодіазепінів, які містять лабільну захисну групу в положенні N10, яка являє собою лінкер до агента, що зв'язується з клітинами.

Рівень Техніки

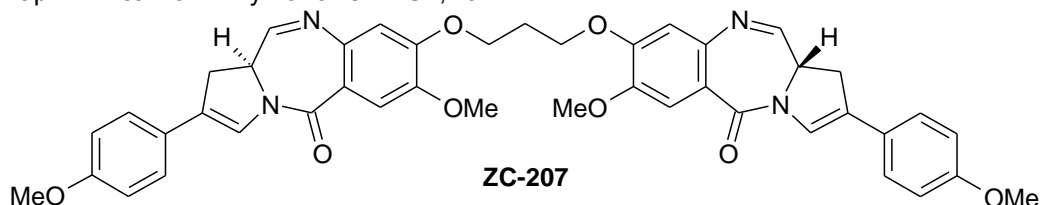
5 Піролбензодіазепіни

Деякі піролбензодіазепіни (PBD) здатні розпізнавати конкретні послідовності ДНК і зв'язуватися з ними, при цьому переважна послідовність являє собою PuGPy. Перший піролбензодіазепіновий (PBD) протипухлинний антибіотик, антраміцин, був відкритий у 1965 р. (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 10 87, 5791-5793 (1965)). З того часу був описаний ряд природних PBD та було розроблено понад 10 способів синтезу різних їхніх аналогів (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)). Представники зазначеного сімейства включають еббіміцин (abbeymycin) (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), чікаміцин (chicamycin) (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (патент Японії 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., 15 Тетраедрон, 48, 751-758 (1992)), мазетраміцин (mazethramycin) (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), неотраміцини (neothramycin) A і B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), поротраміцин (porothramycin) (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), протракарцин (prothracarcin) (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), сібаноміцин (sibanomicin) (DC-102) (Hara, et al., J. 20 Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), сібіроміцин (sibiromycin) (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) і томаміцин (tomamycin) (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). PBD мають таку загальну структуру:



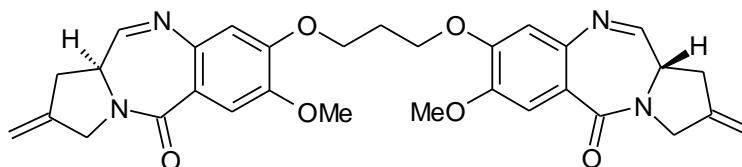
Вони розрізняються за числом, типом та положенням замісників, як у своїх ароматичних А-кільцях, так і в пірольних С-кільцях, та за ступенем насичення С-кільця. У положенні N10-С11 В-кільця, яке являє собою електрофільний центр, відповідальний за алкілування ДНК, знаходиться або імін ($N=C$), або карбіноламін ($NH-CH(OH)$), або метиловий ефір карбіноламіну ($NH-CH(OMe)$). Усі відомі природні продукти мають (S)-конфігурацію хірального центру C11a, що забезпечує правозакручену "твіст"-форму, якщо дивитися з боку С-кільця в напрямку А-кільця. Це надає їм відповідну тривимірну форму для ізоспіральності з малою борозенкою В-форми ДНК, що призводить до точної відповідності у сайті зв'язування (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Їх здатність утворювати аддукт у малій борозенці ДНК дозволяє їм 35 перешкоджати процесингу ДНК, забезпечуючи можливість їх застосування як протипухлинних агентів.

Автори даного винаходу раніше у WO 2005/085251 описали димерні PBD сполуки, які містять арильні замісники у положенні C2, такі як:



Було показано, що зазначені сполуки є високоефективними цитотоксичними агентами.

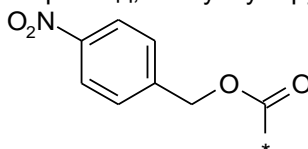
Особливі переваги має піролбензодіазепінова сполука, описана в джерелі Gregson et al. (Chem. Commun. 1999, 797-798) як сполука 1, та в джерелі Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) як сполука 4a. Зазначена сполука, також відома як SJG 136, показана нижче:



SJG-136

Авторами даного винаходу раніше було показано, що PBD сполуку можна використовувати як проліки за допомогою введення в положення N10 захисної групи для азоту, при цьому захисна група здатна віддалятися *in vivo* (WO 00/12507). Багато із зазначених захисних груп

5 являють собою карбамати і мають, наприклад, наступну структуру:



де зірочка (*) позначає місце приєднання до атома N10 в PBD.

Автори даного винаходу також описали отримання PBD сполук, які містять захисну карбаматну групу при атомі азоту в положенні N10 (WO 2005/023814). Захисні групи здатні

10 видалятися з положення N10 фрагмента PBD з утворенням N10-C11 імінного зв'язку. Описано ряд захисних груп, включаючи групи, які можуть відщеплюватися під дією ферментів.

У WO 2007/085930 описано отримання димерних PBD сполук, які містять лінкерні групи для

приєднання до агента, що зв'язується з клітинами, такого як антитіло. Лінкер присутній у

мостику, що пов'язує мономерні ланки PBD димера.

15 Кон'югати антитіло-лікарський засіб

Терапія з використанням антитіл застосовується для спрямованого лікування пацієнтів, які страждають на рак, імунологічні та ангіогенні розлади (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). Застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), тобто імунокон'югатів, для місцевої доставки цитотоксичних або цитостатичних агентів, тобто

20 лікарських засобів для знищення або придушення пухлинних клітин при лікуванні раку, забезпечує спрямовану доставку фрагменту лікарського засобу до пухлини та внутрішньоклітинне накопичення в ній, тоді як системне введення зазначених некон'югованих лікарських агентів може призводити до неприйнятних рівнів токсичності стосовно здорових клітин поряд із пухлинними клітинами, які передбачається знищити (Xie et al (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6 (3):281-291; Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66 (6):3214-3121; Law et al (2006) *Cancer Res.* 66 (4):2328-2337; Wu et al (2005) *Nature Biotech.* 23 (9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15 (9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer research* 19:605-614).

30 Таким чином, дослідження спрямовані на одержання препаратів з максимальною ефективністю при їхній мінімальній токсичності. Спроби розробки та очищення ADC були зосереджені на селективності моноклональних антитіл (mAb), а також на механізмі дії лікарського засобу, властивостях зв'язування з лікарським засобом, відношенні лікарський засіб/антитіло (навантаження) та вивільнення лікарського засобу (Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26 (8):925-932; Dornan et al (2009) *Blood* 114 (13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* +19 (7): 299-307; Doronina et al (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson et al (2006) *Cancer res.* 66 (8):1-8; Sanderson et al (2005) *Clin. Cancer res.* 11:843-852; Jeffrey et al (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer res.* 10:7063-7070). Фрагменти лікарських засобів можуть надавати свою цитотоксичну і цитостатичну дію механізмами, які включають зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомерази. Деякі цитотоксичні лікарські засоби схильні інактивуватися або ставати менш активними при кон'югуванні з великими антитілами або білковими рецепторними лігандами.

Автори даного винаходу розробили новий підхід до отримання кон'югатів PBD з агентами,

45 що зв'язуються з клітинами, і, зокрема, кон'югатів PBD з антитілами.

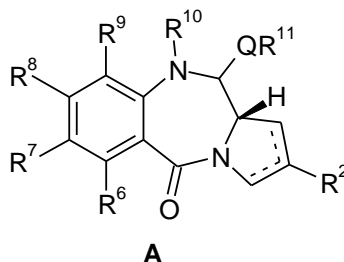
Короткий опис винаходу

Згідно із загальним аспектом даного винаходу запропонований кон'югат, який містить PBD сполуку, приєднану через положення N10 до агента, який зв'язується з клітинами за допомогою лінкера. Лінкер являє собою лабільний лінкер та може являти собою ферментативно-лабільний

50 лінкер. Агент, який зв'язується з клітинами, переважно являє собою антитіло.

Згідно з одним варіантом реалізації винаходу кон'югат містить агент, що зв'язується з клітинами, з'єднаний зі спейсером, при цьому спейсер з'єднаний із тригером, тригер з'єднаний із лінкером, що саморозщеплюється, а лінкер, що саморозщеплюється, пов'язаний із положенням N10 PBD сполуки.

- 5 Згідно з першим аспектом даного винаходу запропоновані нові сполуки, які являють собою кон'югати, формули (A):



та їх солі та сольвати, де:

- пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 та C2 або C2 та C3;

R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R та COR і необов'язково додатково вибраний із галогену або дигалогену;

де R^D незалежно вибраний із R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H й галогену;

- 15 R^6 та R^9 незалежно вибрані з H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^{10} являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, що зв'язується з клітинами;

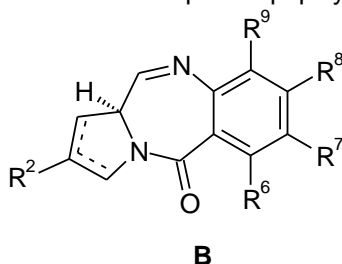
Q незалежно обраний із O, S та NH;

- 20 R^{11} являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO₃M, де M являє собою катіон металу;

кожен R і R" незалежно обраний із необов'язково заміщених C₁₋₁₂ алкільної, C₃₋₂₀ гетероцикільної та C₅₋₂₀ арильної груп, і відносно групи NRR" необов'язково R і R" разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене 4-, 5-, 6- або 7-членне гетероциклічне кільце;

- 25 або будь-яка пара суміжних груп із R⁶ – R⁹ разом утворюють групу -O-(CH₂)_p-O-, де p дорівнює 1 або 2,

або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), або один мономер якого має формулу (A), а інший мономер має формулу (B):



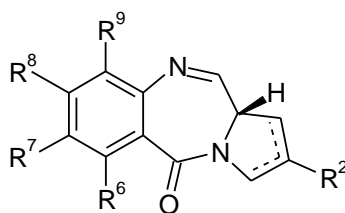
- 30 де R², R⁶, R⁹, R⁷ і R⁸ є такими, як визначено для сполуки формули (A), і групи R⁷ або групи R⁸ кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу -X-R"-X-;

де R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця є необов'язково заміщеними;

- 35 і кожен X являє собою O, S або N(H);

або де зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), причому група R¹⁰ у одному з мономерів являє собою кепуючу групу R^C або являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, що зв'язується з клітинами. Для уникнення невизначеності, агент, що зв'язується з клітинами, являє собою частину групи R¹⁰.

- 40 Даний винахід також відноситься до застосування кон'югату для отримання сполуки формули (C) в області-мішені:



C

та її солі й сольвату, де:

пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2 або C2 і C3;

R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R і COR й необов'язково додатково вибраний із галогену або дигалогену;

де R^D незалежно вибраний із R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H й галогену;

R^6 і R^9 незалежно вибрані з H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R і R" незалежно обрані з необов'язково заміщених C₁₋₁₂ алкільної, C₃₋₂₀ гетероциклільної та C₅₋₂₀ арильної груп, і відносно групи NRR" необов'язково R і R" разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене 4-, 5-, 6- або 7-членне гетероциклічне кільце;

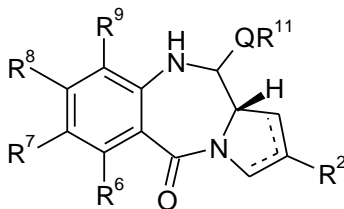
або будь-яка пара суміжних груп з R^6 – R^9 разом утворюють групу -O-(CH₂)_p-O-, де p дорівнює 1 або 2;

або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (C), а групи R⁷ або групи R⁸ кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономер і має формулу -X-R"-X-;

де R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH₂;

і кожен X являє собою O, S або N(H).

Даний винахід також відноситься до застосування кон'югату для отримання сполуки формули (D) в області-мішені:



D

та її солі й сольвату, де:

пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2 або C2 і C3;

R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R та COR і необов'язково додатково вибраний із галогену або дигалогену;

де R^D незалежно вибраний із R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H і галогену;

R^6 і R^9 незалежно вибрані з H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

Q незалежно обраний із O, S і NH;

R¹¹ являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO₃M, де M являє собою катіон металу;

кожен R і R" незалежно обраний із необов'язково заміщених C₁₋₁₂ алкільної, C₃₋₂₀ гетероциклільної та C₅₋₂₀ арильної груп, і відносно групи NRR" необов'язково R і R" разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене 4-, 5-, 6- або 7-членне гетероциклічне кільце;

або будь-яка пара суміжних груп із R^6 – R^9 разом утворюють групу -O-(CH₂)_p-O-, де p дорівнює 1 або 2;

або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (D), або один мономер якого має формулу (D), а інший мономер має формулу (C);

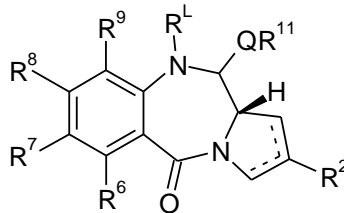
і групи R^7 або групи R^8 кожного мономеру разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу $-X-R''-X-$;

5 де R'' являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH_2 ;

і кожен X являє собою O, S або N(H);

10 де мономерна одиниця формули (C) є такою, як визначено вище.

Згідно з даним винаходом також запропоновані сполуки формули (E) для застосування для отримання сполук, які представляють собою кон'югати згідно з даним винаходом:



E

та їх солей і сольватів, де:

15 пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2 або C2 і C3;

R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R та COR і необов'язково додатково вибраний із галогену або дигалогену;

де R^D незалежно вибраний із R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H й галогену;

20 R^6 і R^9 незалежно вибрані з H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR'', NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR'', NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR'', NO₂, Me₃Sn й галогену;

R^L являє собою лінкер для з'єднання з агентом, що зв'язується з клітинами;

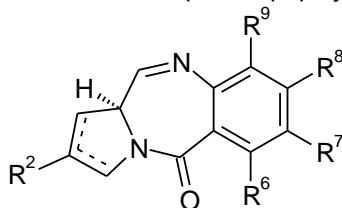
Q незалежно обраний із O, S і NH;

25 R^{11} являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO₃M, де M являє собою катіон металу;

кожен R і R'' незалежно обраний із необов'язково заміщеної C_{1-12} алкільної, C_{3-20} гетероциклическої та C_{5-20} арильної групи, і відносно групи NRR'' необов'язково R і R'' разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене 4-, 5-, 6- або 7-членне гетероциклическе кільце;

30 або будь-яка пара суміжних груп із R^6-R^9 разом утворюють групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2;

або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (E), або один мономер якого має формулу (E), а інший мономер має формулу (B):



B

35 де R^2 , R^6 , R^9 , R^7 і R^8 є такими, як визначено для сполуки формули (A), і групи R^7 або групи R^8 кожного мономеру разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу $-X-R''-X-$;

40 де R'' являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH_2 ;

і кожен X являє собою O, S або N(H);

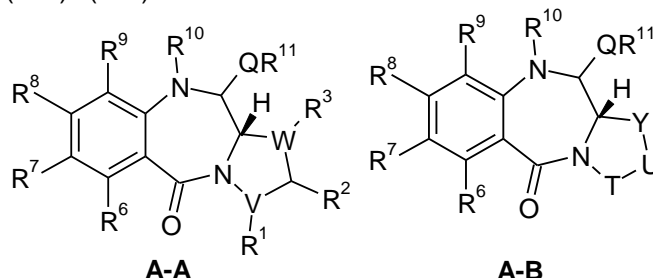
45 і де зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (E), при цьому група R^L в одному з мономерів являє собою кепуючу групу, R^C або являє собою лінкер

для з'єднання з агентом, що зв'язується з клітинами.

Альтернативно, згідно з одним варіантом реалізації винаходу, R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH₂.

Альтернативно, нові сполуки, які представляють собою кон'югати, можуть бути вибрані зі сполук формули (A), як описано вище, і (A-I),

де (A-I) вибрано з (A-A) і (A-B):



та їх солей і сольватів, де:

R⁶, R⁹, R¹⁰, Q, R¹¹, R і R" є такими, як визначено для сполуки формули (A);

R⁷ незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

R⁸ незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn й галогену;

або будь-яка пара суміжних груп із R⁶-R⁹ разом утворюють групу -O-(CH₂)_p-O-, де p дорівнює 1 або 2,

R² з будь-яким із R¹ або R³ разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворює необов'язково заміщене бензольне кільце;

кожен V і W вибраний із (CH₂)_n, O, S, NR, CHR і CRR", де n дорівнює 1, 2 або 3, за винятком того, що V являє собою C, коли R¹ і R² разом із атомами вуглецю C-кільця, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце, і W являє собою C, коли R³ і R² разом із атомами вуглецю C-кільця, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце;

T вибраний із CH₂, NR, CO, BH, SO та SO₂;

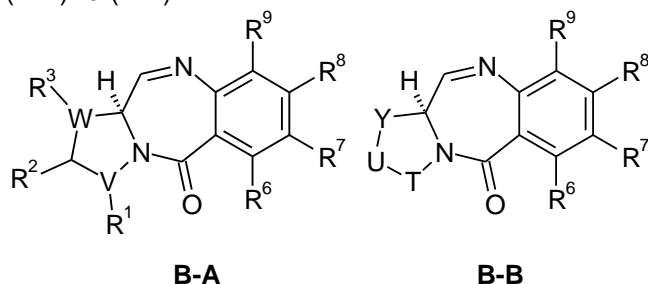
U вибраний із CH₂, NR, O та S;

Y являє собою (CH₂)_n, де n дорівнює 1, 2, 3 або 4;

за винятком того, що не всі з T, U та Y являють собою CH₂;

або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), кожен мономер якого має формулу (A-I), один мономер якого має формулу (A), а інший мономер має формулу (B), як описано вище, чи (B-I), або один мономер якого має формулу (A-I), а інший мономер має формулу (B) чи (B-I),

а (B-I) вибраний із (B-A) та (B-B):



де R¹, R², R³, R⁶, R⁹, R⁷ і R⁸ є такими, як визначено для сполуки формули (A-I), і групи R⁷ або групи R⁸ кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу -X-R"-X-;

де R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять в якості замісник NH₂;

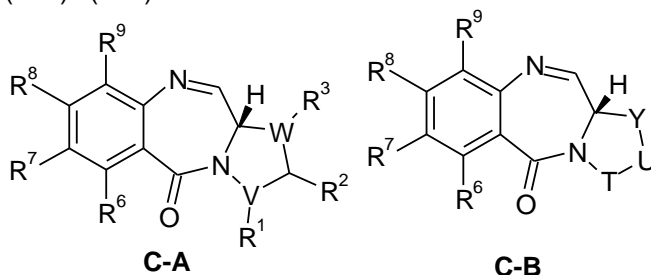
і кожен X являє собою O, S або N(H);

і де зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A-I) і/або формулу (A), при цьому група R¹⁰ в одному з мономерів являє собою кепуючу групу R^C або являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, що зв'язується з клітинами.

Для зручності всі посилання на сполуку A можуть застосовуватися до A-I (і A-A, і A-B) й усі

посилання на сполуку В можуть застосовуватися до В-I (і В-A, і В-B). Аналогічно, посилання на сполуку С, D і Е також відноситься відповідно до (С-I), (D-I) і (Е-I).

Альтернативно, зазначений кон'югат можна застосовувати для одержання сполуки в області-мішені, де сполука являє собою сполуку формули (С), як описано вище, або (С-I), де (С-I) вибрано з (С-A) і (С-B):



та їх солей і сольватів, де:

R^6 , R^9 , R і R'' є такими, як визначено для сполуки формули (С);

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR'' , NO_2 , Me_3Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR'' , NO_2 , Me_3Sn й галогену;

або будь-яка пара суміжних груп із R^6 - R^9 разом утворює групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2,

R^2 з будь-яким із R^1 або R^3 разом із атомами вуглецю С-кільця, до яких вони приєднані, утворює необов'язково заміщене бензольне кільце;

кожен V та W вибраний із $(CH_2)_n$, O, S, NR, CHR і CRR'' , де n дорівнює 1, 2 або 3, за винятком того, що V являє собою C, коли R^1 і R^2 разом із атомами вуглецю С-кільця, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце, і W являє собою C, коли R^3 та R^2 разом із атомами вуглецю С-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце;

T вибраний із CH_2 , NR, CO, BH, SO та SO_2 ;

U вибраний із CH_2 , NR, O та S;

Y являє собою $(CH_2)_n$, де n дорівнює 1, 2, 3 або 4;

за винятком того, що не всі з T, U та Y являють собою CH_2 ;

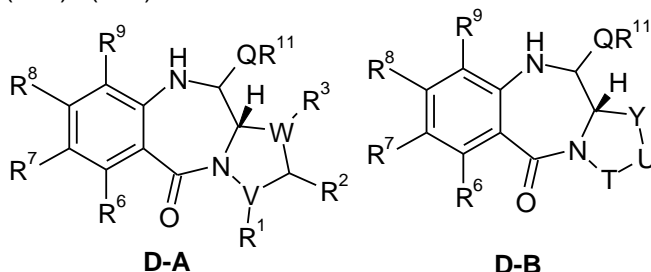
або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (С), кожен мономер якого має формулу (С-I), або один мономер якого має формулу (С), а інший мономер має формулу (С-I), а групи R^7 або групи R^8 кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу $-X-R''-X-$;

де R'' являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe та/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH_2 ;

і кожен X являє собою O, S або N(H).

Даний винахід також відноситься до застосування кон'югату для отримання сполуки в області-мішені, де зазначена сполука являє собою сполуку формули (D), як описано вище, або формули (D-I);

де (D-I) вибрано з (D-A) і (D-B):



та їх солей і сольватів, де:

R^6 , R^9 , R і R'' є такими, як визначено для сполуки формули (D);

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR'' , NO_2 , Me_3Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR'' , NO_2 , Me_3Sn й галогену;

або будь-яка пара суміжних груп із R^6 - R^9 разом утворює групу $O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2,

Q незалежно обраний з O, S і NH;

R^{11} являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO_3M , де M являє собою катіон металу;

R^2 з будь-яким із R^1 або R^3 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворює необов'язково заміщене бензольне кільце;

5 кожен V та W вибраний із $(CH_2)_n$, O, S, NR, CHR і CRR", де n дорівнює 1, 2 або 3, за винятком того, що V являє собою C, коли R^1 і R^2 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце, і W являє собою C, коли R^3 і R^2 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце;

10 T вибраний із CH_2 , NR, CO, BH, SO та SO_2 ;

U вибраний із CH_2 , NR, O та S;

Y являє собою $(CH_2)_n$, де n дорівнює 1, 2, 3 або 4;

за винятком того, що не всі з T, U та Y являють собою CH_2 ;

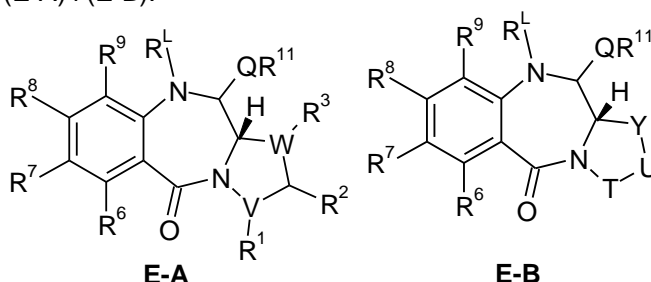
15 або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (D), кожен мономер якого має формулу (D-I), або один мономер якого має формулу (D), а інший мономер має формулу (D-I), й групи R^7 або групи R^8 кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу -X-R"-X-;

20 де R" являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH_2 ;

і кожен X являє собою O, S або N(H).

25 Альтернативно, згідно з даним винаходом також для застосування запропоновані сполуки формули (E), як описано вище, і (E-I) для одержання сполук, що являють собою кон'югати згідно з даним винаходом;

де (E-I) вибрано з (E-A) і (E-B):



та їх солей і сольватів, де:

R^6 , R^9 , R і R" є такими, як визначено для сполуки формули (D);

30 R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR", NO_2 , Me_3Sn й галогену;

R^8 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR", NO_2 , Me_3Sn й галогену;

або будь-яка пара суміжних груп із R^6 - R^9 разом утворює групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2,

R^{11} являє собою лінкер для з'єднання з агентом, який зв'язується з клітинами;

35 Q незалежно обраний із O, S і NH;

R^{11} являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO_3M , де M являє собою катіон металу;

R^2 з будь-яким із R^1 або R^3 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворює необов'язково заміщене бензольне кільце;

40 кожен V та W вибраний із $(CH_2)_n$, O, S, NR, CHR і CRR", де n дорівнює 1, 2 або 3, за винятком того, що V являє собою C, коли R^1 і R^2 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце, і W являє собою C, коли R^3 і R^2 разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце;

45 T вибраний із CH_2 , NR, CO, BH, SO і SO_2 ;

U вибраний із CH_2 , NR, O і S;

Y являє собою $(CH_2)_n$, де n дорівнює 1, 2, 3 або 4;

за винятком того, що не всі з T, U та Y являють собою CH_2 ;

50 або зазначена сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (E), кожен мономер якого має формулу (E-I), або один мономер якого має формулу (E) чи (E-1), а інший мономер має формулу (E), (E-I), (B) або (B-1);

і групи R^7 або групи R^8 кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує

мономери і має формулу $-X-R-X-$;

де R являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як

замісник NH_2 ;

і кожен X являє собою O, S або N(H).

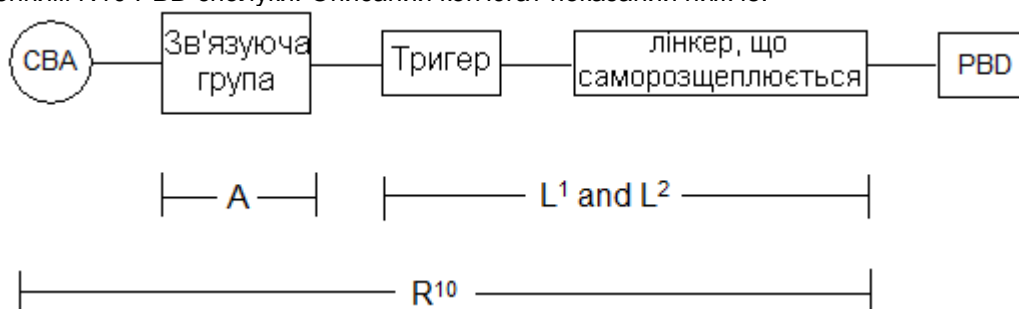
Короткий опис фігур

На Фігурі 1 показані конкретні варіанти реалізації даного винаходу;

На Фігурі 2-6 показані результати біологічних аналізів для конкретних варіантів реалізації даного винаходу.

Детальний опис винаходу

Згідно з даним винаходом запропонований кон'югат, який містить PBD сполуку, приєднану за допомогою лінкера через положення N10 до агента, який зв'язується з клітинами. Згідно з одним варіантом реалізації винаходу кон'югат містить агент, який зв'язується з клітинами, з'єднаний зі спейсерною зв'язуючою групою, при цьому спейсер з'єднаний із тригером, а тригер з'єднаний із лінкером, що саморозщеплюється, а лінкер, що саморозщеплюється, з'єднаний із положенням N10 PBD сполуки. Описаний кон'югат показаний нижче:



де CBA являє собою агент, що зв'язується з клітинами, а PBD являє собою піролбензодіазепінову сполуку згідно з даним винаходом. На ілюстрації показані фрагменти, які відповідають R^{10} , A, L^1 і L^2 в конкретних варіантах реалізації винаходу.

Даний винахід підходить для застосування при отриманні PBD сполуки в переважній області у тілі суб'єкта. Згідно з переважними варіантами реалізації даного винаходу кон'югат забезпечує вивільнення активної PBD сполуки, яка не містить будь-яких фрагментів лінкера. При цьому не спостерігається будь-яких залишків, які могли б впливати на реакційну здатність PBD сполуки.

Згідно з певними варіантами реалізації винаходу запропоновані кон'югати, які містять PBD димерну групу, що містить лінкер, з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами. Автори даного винаходу описують в даному тексті способи синтезу, які дозволяють отримати такі димерні кон'югати шляхом застосування нових методів десиметризації PBD.

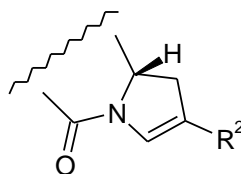
Переважні варіанти

Наступні переважні варіанти можуть бути застосовні до всіх аспектів винаходу, описаних вище, чи можуть відноситися до одного аспекту. Переважні варіанти можна об'єднувати в будь-якій комбінації.

Подвійний зв'язок

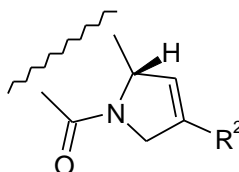
Згідно з одним варіантом реалізації подвійний зв'язок між C1 та C2 і C2 та C3 відсутній.

Згідно з одним варіантом реалізації пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C2 і C3, як показано нижче:



Згідно з одним варіантом реалізації подвійний зв'язок присутній між C2 і C3, коли R^2 являє собою C_{5-20} арил або C_{1-12} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації пунктирні лінії позначають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2, як показано нижче:



Згідно з одним варіантом реалізації подвійний зв'язок між C1 і C2 присутній, коли R^2 являє собою C_{5-20} арил або C_{1-12} алкіл.

R^2

5 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R та COR і необов'язково додатково вибраний із галогену або дигалогену.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно вибраний із H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R і COR.

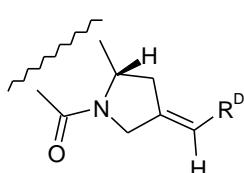
10 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно вибраний із H, =O, =CH₂, R, =CH-R^D і =C(R^D)₂.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою H.

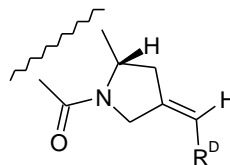
Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою =O.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою =CH₂.

15 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою =CH-R^D. У PBD сполуці група =CH-R^D може мати будь-яку конфігурацію, показану нижче:



(I)



(II)

Згідно з одним варіантом реалізації зазначена конфігурація являє собою конфігурацію (I).

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою =C(R^D)₂.

20 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою =CF₂.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою R.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил.

25 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{1-12} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-7} арил.

30 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{8-10} арил.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений феніл.

35 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений нафтил.

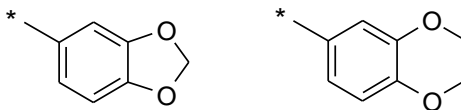
Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений піридил.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений хінолініл або ізохінолініл.

40 Згідно з одним варіантом реалізації R^2 містить від однієї до трьох груп як замісники, більш переважно 1 і 2 групи, й найбільш переважно містить як замісник одну групу. Замісники можуть знаходитися в будь-якому положенні.

45 Коли R^2 являє собою C_{5-7} арильну групу, єдиний замісник переважно знаходиться у атомі кільця, який не є суміжним зі зв'язком із іншою частиною сполуки, тобто переважно знаходиться в β або γ положенні відносно зв'язку з іншою частиною сполуки. Отже, коли C_{5-7} арильна група являє собою феніл, замісник переважно знаходиться в мета- або пара-положенні й більш переважно в пара-положенні.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 вибраний із:



де зірочка позначає місце приєднання.

Коли R^2 являє собою C_{8-10} арильну групу, наприклад, хінолініл або ізохінолініл, він може містити будь-яку кількість замісників у будь-якому положенні в хіноліновому або ізохіноліновому кільці. Згідно з деякими варіантами реалізації він містить один, два або три замісника, й зазначені замісники можуть знаходитися як у проксимальному, так і в дистальному кільці, або в обох кільцях (якщо міститься більше одного замісника).

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо R^2 є необов'язково заміщеним, замісники обрані з замісників, представлених нижче в розділі з описом замісників.

Коли R є необов'язково заміщеним, замісники переважно вибрані з:

галогену, гідроксилу, простої ефірної групи, формілу, ацилу, карбокси, складноефірної групи, ацилокси, аміно, амідю, ациламідю, амінокарбонілокси, уреїдо, нітро, ціано та тіоефірної групи.

Згідно з одним варіантом реалізації, коли R або R^2 є необов'язково заміщеними, замісники вибрані з групи, яка складається з R, OR, SR, NRR", NO_2 , галогену, CO_2R , COR, $CONH_2$, CONHR та CONRR".

Коли R^2 являє собою C_{1-12} алкіл, необов'язковий замісник може додатково включати C_{3-20} гетероциклільні та C_{5-20} арильні групи.

Коли R^2 являє собою C_{3-20} гетероцикліл, необов'язковий замісник може додатково включати C_{1-12} алкільні та C_{5-20} арильні групи.

Коли R^2 являє собою C_{5-20} арильні групи, необов'язковий замісник може додатково включати C_{3-20} гетероциклільні та C_{1-12} алкільні групи.

Очевидно, що термін "алкіл" включає підкласи алкенів та алкінів, а також циклоалкіл. Таким чином, якщо R^2 являє собою необов'язково заміщений C_{1-12} алкіл, це означає, що алкільна група необов'язково містить один або більше вуглець-вуглецевий подвійний чи потрійний зв'язок, який може утворювати фрагмент кон'югованої системи. Згідно з одним варіантом реалізації необов'язково заміщена C_{1-12} алкільна група містить щонайменше один вуглець-вуглецевий подвійний чи потрійний зв'язок, і зазначений зв'язок є кон'югованим із подвійним зв'язком, присутнім між C1 та C2 або C2 та C3. Згідно з одним варіантом реалізації C_{1-12} алкільна група являє собою групу, вибрану з насиченого C_{1-12} алкілу, C_{2-12} алкенілу, C_{2-12} алкінілу та C_{3-12} циклоалкілу.

Якщо замісник в R^2 являє собою галоген, то він переважно являє собою F або Cl, більш переважно Cl.

Якщо замісник в R^2 являє собою просту ефірну групу, то згідно з деякими варіантами реалізації винаходу він може являти собою алкокси-групу, наприклад, C_{1-7} алкокси-групу (наприклад метокси, етокси), або згідно з деякими варіантами реалізації він може являти собою C_{5-7} арилокси-групу (наприклад, фенокси, піриділокси, фуранілокси).

Якщо замісник в R^2 являє собою C_{1-7} алкіл, то він переважно може являти собою C_{1-4} алкільну групу (наприклад метил, етил, пропіл, бутіл).

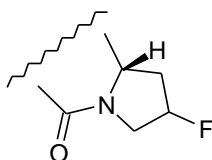
Якщо замісник в R^2 являє собою C_{3-7} гетероцикліл, то згідно з деякими варіантами реалізації він може являти собою C_6 азотовмісну гетероциклільну групу, наприклад, морфоліно, тіоморфоліно, піперидин, піперазиніл. Зазначені групи можуть бути пов'язані з іншою частиною PBD фрагмента через атом азоту. Зазначені групи також можуть містити замісник, наприклад, C_{1-4} алкільну групу.

Якщо замісник в R^2 являє собою біс-окси- C_{1-3} алкіл, то він переважно являє собою біс-оксиметилен або біс-оксиетилен.

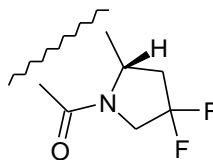
Особливо переважні замісники для R^2 включають метокси, етокси, фтор, хлор, ціано, біс-оксиметилен, метилпіперазиніл, морфоліно й метилтієніл.

Особливо переважні заміщені R^2 групи включають, але не обмежуються ними, 4-метоксифеніл, 3-метоксифеніл, 4-етоксифеніл, 3-етоксифеніл, 4-фторфеніл, 4-хлорфеніл, 3,4-біс-оксиметиленфеніл, 4-метилтієніл, 4-ціанофеніл, 4-феноксифеніл, хінолін-3-іл та хінолін-6-іл, ізохінолін-3-іл та ізохінолін-6-іл, 2-тієніл, 2-фураніл, метоксинафтил і нафтил.

Згідно з одним варіантом реалізації R^2 являє собою галоген або дигалоген. Згідно з одним варіантом реалізації R^2 являє собою -F або -F₂, зазначені замісники показані нижче як (III) та (IV) відповідно:



(III)



(IV)

R^D

Згідно з одним варіантом реалізації R^D незалежно вибраний із R, CO_2R , COR, CHO, CO_2H і галогену.

5 Згідно з одним варіантом реалізації R^D незалежно являє собою R.

Згідно з одним варіантом реалізації R^D незалежно являє собою галоген.

R^6

Згідно з одним варіантом реалізації R^6 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR", NO_2 , Me_3Sn - і галогену.

10 Згідно з одним варіантом реалізації R^6 незалежно вибраний із H, OH, OR, SH, NH_2 , NO_2 й галогену.

Згідно з одним варіантом реалізації R^6 незалежно вибраний із H і галогену.

Згідно з одним варіантом реалізації R^6 незалежно являє собою H.

15 Згідно з одним варіантом реалізації R^6 та R^7 разом утворюють групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2.

R^7

R^7 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR", NO_2 , Me_3Sn й галогену.

Згідно з одним варіантом реалізації R^7 незалежно являє собою OR.

20 Згідно з одним варіантом реалізації R^7 незалежно являє собою OR^{7A} , де R^{7A} незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{1-6} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{7A} незалежно являє собою необов'язково заміщений насичений C_{1-6} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{7A} незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{2-4} алкеніл.

25 Згідно з одним варіантом реалізації R^{7A} незалежно являє собою Me.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{7A} незалежно являє собою CH_2Ph .

Згідно з одним варіантом реалізації R^{7A} незалежно являє собою аліл.

30 Згідно з одним варіантом реалізації зазначена сполука являє собою димер, де групи R^7 кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу $X-R''-X$.

R^8

Згідно з одним варіантом реалізації зазначена сполука являє собою димер, де групи R^8 кожного мономера разом утворюють димерний мостик, який зв'язує мономери і має формулу $X-R''-X$.

35 Згідно з одним варіантом реалізації R^8 незалежно являє собою OR^{8A} , де R^{8A} незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{1-4} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{8A} незалежно являє собою необов'язково заміщений насичений C_{1-6} алкіл або необов'язково заміщений C_{2-4} алкеніл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{8A} незалежно являє собою Me.

40 Згідно з одним варіантом реалізації R^{8A} незалежно являє собою CH_2Ph .

Згідно з одним варіантом реалізації R^{8A} незалежно являє собою аліл.

Згідно з одним варіантом реалізації R^8 і R^7 разом утворюють групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2.

45 Згідно з одним варіантом реалізації R^8 і R^9 разом утворюють групу $-O-(CH_2)_p-O-$, де p дорівнює 1 або 2.

R^9

Згідно з одним варіантом реалізації R^9 незалежно вибраний із H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR", NO_2 , Me_3Sn - і галогену.

Згідно з одним варіантом реалізації R^9 незалежно являє собою H.

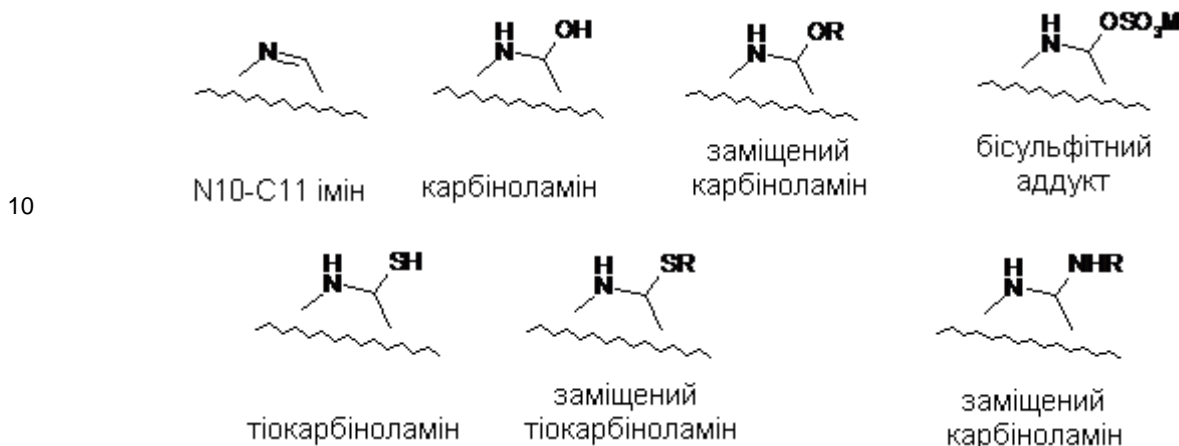
50 Згідно з одним варіантом реалізації R^9 незалежно являє собою R або OR.

R^{10}

Щоб уникнути неправильного тлумачення, якщо R^{10} являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами, зазначений агент, який зв'язується з клітинами, являє

собою фрагмент групи R^{10} .

Згідно з певними варіантами реалізації даного винаходу, якщо кон'югат являє собою димер, який містить два мономері А, то один мономер містить групу R^{10} , яка являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами, а інший мономер містить групу R^{10} , яка являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами, або кепуючу групу R^C . Переважно інший мономер містить групу R^{10} , яка являє собою кепуючу групу R^C . Таким чином, згідно із зазначеним переважним варіантом реалізації винаходу існує тільки один зв'язок із агентом, який зв'язується з клітинами.



де R і M є такими, як визначено для кон'югатів згідно з даним винаходом.

Згідно з одним варіантом реалізації група R^{10} здатна видалятися з положення N10 PBD фрагмента з утворенням N10-C11 імінного зв'язку.

Згідно з деякими варіантами реалізації кон'югат згідно з даним винаходом являє собою димерну сполуку, яка містить мономер формули (A) та мономер формули (B). Згідно із зазначеним варіантом реалізації група R^{10} не повинна бути здатною видалятися з положення N10, оскільки мономер (B) містить відповідну функціональну групу в положеннях N10 і C11, яка забезпечує біологічну активність.

Однак, переважно група R^{10} здатна видалятися з отриманням димера, який містить підходящу функціональну групу в положеннях N10 і C11 в обох мономерних ланках. Така функціональна група вважається необхідною для забезпечення перехресного зшивання PBD димера.

Дана заявка, зокрема, відноситься до таких R^{10} груп, які з'єднані з положенням N10 карбаматним зв'язком.

Лінкер з'єднує агент (CBA), який зв'язується з клітинами, наприклад, антитіло, з фрагментом D лікарського засобу PBD за допомогою ковалентного зв'язку (зв'язків). Лінкер являє собою біфункціональний або мультифункціональний фрагмент, який можна використовувати для зв'язування одного або більше фрагментів лікарського засобу (D) та одиниці антитіла (Ab) з утворенням кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC). Лінкер (L) може бути стабільним за межами клітини, тобто позаклітинно, або ж він може піддаватися розщепленню під дією ферментативної активності, гідролізу або в умовах інших процесів метаболізму. Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) зручно отримувати з використанням лінкера, який містить реакційноздатну функціональну групу для зв'язування з фрагментом лікарського засобу та з антитілом. Тіолова група цистеїну або амінна група, наприклад, N-кінцевий або бічний ланцюг амінокислоти, такої як лізин, в антитілі (Ab) може утворювати зв'язок із функціональною групою лінкерного або спейсерного реагента, фрагментом PBD лікарського засобу (D) або комплексом лікарський засіб-лінкерний реагент (DL).

Багато функціональних груп у лінкері, приєднаному до положення N10 PBD фрагмента, можуть бути задіяні для зв'язування з агентом, який зв'язується з клітинами. Наприклад, складноефірні, складнотіоефірні, амідні, тіоамідні, карбаматні, тіокарбаматні, сечовинні, тіосечовинні, прості ефірні, прості тіоефірні або дисульфідні зв'язки можуть утворюватися в результаті взаємодії інтермедіату лінкер-PBD лікарський засіб з агентом, який зв'язується з клітинами.

Лінкери ADC переважно запобігають агрегації молекул ADC і забезпечують знаходження ADC у вільно розчинній у водному середовищі формі і в мономерному стані.

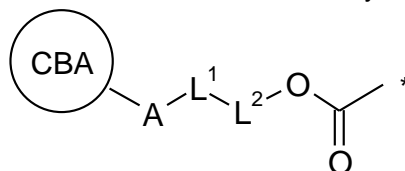
Лінкери ADC переважно є стабільними поза клітинами. До транспортування або доставки в клітину кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) переважно є стабільним і залишається

інтактним, тобто антитіло залишається пов'язаним із фрагментом лікарського засобу. Лінкери є стабільними поза клітинами-мішенями і можуть розщеплюватися з деякою ефективною швидкістю всередині клітин. Ефективний лінкер: (i) підтримує властивості специфічного зв'язування антитіла; (ii) забезпечує внутрішньоклітинну доставку кон'югату або фрагмента лікарського засобу; (iii) залишається стабільним та інтактним, тобто не розщеплюється до моменту доставки або транспортування зазначеного кон'югату до області-мішені; і (iv) підтримує цитотоксичну дію, яка призводить до знищення клітин, або цитостатичну дію фрагмента РВД лікарського засобу. Стабільність ADC можна визначити за допомогою стандартних аналітичних методів, таких як мас-спектрометрія, ВЕРХ та метод розділення/аналізу РХ/МС.

Для ковалентного зв'язування антитіла та фрагмента лікарського засобу необхідно, щоб лінкер мав дві реакційноздатні функціональні групи, тобто був бівалентним з точки зору реакційноздатності. Бівалентні лінкерні реагенти, які можуть використовуватися для скріплення двох або більше функціональних або біологічно активних фрагментів, таких як пептиди, нуклеїнові кислоти, лікарські засоби, токсини, антитіла, гаптени та репортерні групи, є відомими, а також описані способи одержання кон'югатів із використанням зазначених лінкерів (Hermanson, GT (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242).

Згідно з іншим варіантом реалізації лінкер може містити як замісники групи, які модулюють агрегацію, розчинність або реакційноздатність. Наприклад, сульфонатний замісник може підвищувати розчинність реагента у воді і полегшувати реакцію поєднання лінкерного реагента з антитілом чи фрагментом лікарського засобу або полегшувати реакцію поєднання Ab-L з D чи D-L з Ab, в залежності від схеми синтезу, який використовується для одержання ADC.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{10} являє собою наступну групу:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, L^1 являє собою лінкер, A являє собою групу, яка зв'язує L^1 з агентом, який зв'язується з клітинами, L^2 являє собою ковалентний зв'язок або разом із $-OC(=O)-$ утворює лінкер, що саморозщеплюється, а L^1 або L^2 являє собою здатний до розщеплення лінкер.

L^1 переважно являє собою здатний до розщеплення лінкер і може називатися тригером для активації розщеплення лінкера.

Природа L^1 і L^2 , при його наявності, може сильно варіюватися. Зазначені групи вибираються відповідно до їх здатності до розщеплення, яка може залежати від умов у області-мішені, до якої доставляється кон'югат. Лінкери, які розщеплюються під дією ферментів, є переважними, незважаючи на те, що також можуть використовуватися лінкери, здатні до розщеплення при зміні рН (наприклад, кислотолабільні або лужнолабільні), температури або при опроміненні (наприклад, фотоллабільні). Лінкери, здатні до розщеплення в присутності відновника або окислювача, також можуть використовуватися згідно з даним винаходом.

L^1 може містити безперервну послідовність амінокислот. Амінокислотна послідовність може являти собою субстратну мішень для ферментативного розщеплення, забезпечуючи за рахунок цього вивільнення R^{10} з положення N10.

Згідно з одним варіантом реалізації L^1 розщеплюється під дією ферменту. Згідно з одним варіантом реалізації фермент являє собою естеразу або пептидазу.

Згідно з одним варіантом реалізації L^2 є присутнім і разом із $-C(=O)O-$ утворює лінкер, що саморозщеплюється. Згідно з одним варіантом реалізації L^2 являє собою субстрат для ферментативної активності, таким чином забезпечуючи вивільнення R^{10} з положення N10.

Згідно з одним варіантом реалізації, коли L^1 розщеплюється під дією ферменту і присутній L^2 , фермент розщеплює зв'язок між L^1 і L^2 .

L^1 і L^2 , за наявності, можуть бути зв'язані за допомогою зв'язку, вибраного з:

- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH- та

-NHC(=O)NH-

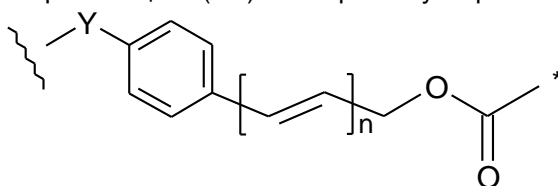
Аміногрупа L^1 , яка зв'язується з L^2 , може являти собою N-кінець амінокислоти або може походити з аміногрупи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга амінокислоти лізину.

5 Карбоксильна група L^1 , яка зв'язується з L^2 , може являти собою C-кінець амінокислоти або може походити з карбоксильної групи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга глутамінової кислоти.

Гідроксильна група L^1 , яка зв'язується з L^2 , може походити з гідроксильної групи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга амінокислоти серину.

10 Термін "бічний ланцюг амінокислоти" включає групи, які зустрічаються в: (i) природних амінокислотах, таких як аланін, аргінін, аспарагін, аспарагінова кислота, цистеїн, глутамін, глутамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, тирозин і валін; (ii) мінорних амінокислотах, таких як орнітин і цитрулін; (iii) неприродних амінокислотах, бета-амінокислотах, синтетичних аналогах і похідних природних амінокислот; та (iv) усіх енантіомерах, діастереомерах, ізомерно збагачених формах, мічених ізотопом формам (наприклад, ^2H , ^3H , ^{14}C , ^{15}N), захищених формах і їхніх рацемічних сумішах.

Згідно з одним варіантом реалізації -C(=O)O- і L^2 разом утворюють групу:



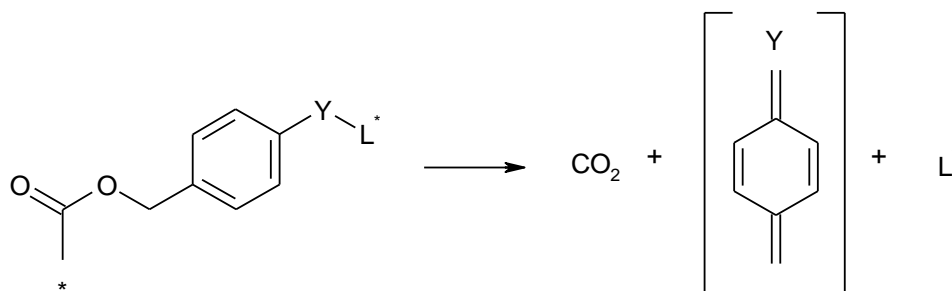
20 де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, хвиляста лінія позначає місце приєднання до лінкера L^1 , Y являє собою -N(H)-, -O-, -C(=O)N(H)- або -C(=O)O-, а n дорівнює 0-3. Феніленове кільце необов'язково містить як замісник один, два або три замісника, описаних у даному тексті. Згідно з одним варіантом реалізації феніленова група необов'язково містить як замісник галоген, NO_2 , R або OR.

25 Згідно з одним варіантом реалізації Y являє собою NH.

Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 0 або 1. Переважно n дорівнює 0.

Коли Y являє собою NH і n дорівнює 0, лінкер, що саморозщеплюється, може називатися п-амінобензилкарбонільним лінкером (PABC).

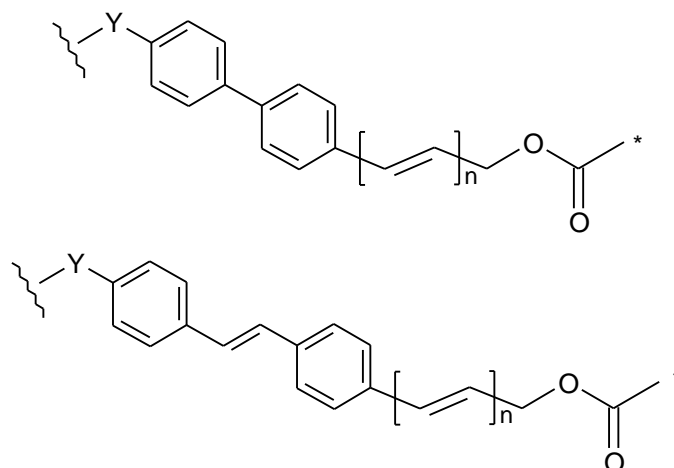
30 Лінкер, що саморозщеплюється, забезпечує вивільнення захищеної сполуки при активації віддаленого сайту, діючи таким чином, як показано нижче (для $n=0$):



де L^* являє собою активовану форму фрагмента частини лінкера, який залишився. Зазначені групи мають перевагу, яка полягає в тому, що сайт активації відділений від сполуки, яка піддається захисту. Як описано вище, феніленова група може бути необов'язково заміщеною.

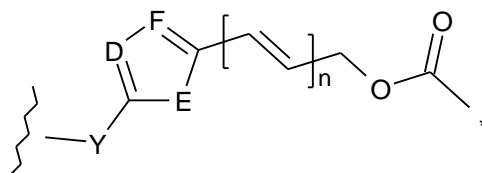
35 Згідно з одним варіантом реалізації, описаним у даному тексті, група L^* являє собою лінкер L^1 згідно з даним описом, який може містити дипептидну групу.

Згідно з іншим варіантом реалізації -C(=O)O- і L^2 разом утворюють групу, вибрану з наступних:



де зірочка, хвиляста лінія, Y і n є такими, як визначено вище. Кожне феніленове кільце необов'язково містить один, два або три замісники, описані в даному тексті. Згідно з одним варіантом реалізації феніленове кільце, яке містить замісник Y, є необов'язково заміщеним, а феніленове кільце, яке не містить замісника Y, є незаміщеним. Згідно з одним варіантом реалізації феніленове кільце, яке містить замісник Y, є незаміщеним, а феніленове кільце, яке не містить замісника Y, є необов'язково заміщеним.

Згідно з іншим варіантом реалізації $-(=O)O-$ і L^2 разом утворюють групу, вибрану з:



де зірочка, хвиляста лінія, Y і n є такими, як визначено вище, E являє собою O, S або NR, D являє собою N, CH або CR, і F являє собою N, CH або CR.

Згідно з одним варіантом реалізації D являє собою N.

Згідно з одним варіантом реалізації D являє собою CH.

Згідно з одним варіантом реалізації E являє собою O або S.

Згідно з одним варіантом реалізації F являє собою CH.

Згідно з переважним варіантом реалізації лінкер являє собою катепсиновий лабільний лінкер.

Згідно з одним варіантом реалізації L^1 містить дипептид. Зазначений дипептид може являти собою $-NH-X_1-X_2-CO-$, де $-NH-$ і $-CO-$ являють собою N- і C-кінці амінокислотних груп X_1 і X_2 відповідно. Амінокислоти у дипептиді можуть являти собою будь-яку комбінацію природних амінокислот. Коли лінкер являє собою катепсиновий лабільний лінкер, дипептид може являти собою місце дії для катепсин-опосередкованого розщеплення.

Крім того, для зазначених амінокислотних груп, які містять карбоксильну або амінну функціональну групу бічного ланцюга, наприклад, Glu і Lys відповідно, CO і NH можуть являти собою зазначені функціональні групи бічного ланцюга.

Згідно з одним варіантом реалізації група $-X_1-X_2-$ у дипептиді $-NH-X_1-X_2-CO-$ вибрана з:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-,

-Phe-Cit-,

-Leu-Cit-,

-Ile-Cit-,

-Phe-Arg-,

-Trp-Cit-

де Cit являє собою цитрулін.

Переважно група $-X_1-X_2-$ у дипептиді $-NH-X_1-X_2-CO-$ вибрана з:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,
 -Ala-Lys-,
 -Val-Cit-.

Найбільш переважно група $-X_1-X_2-$ в дипептиді $-NH-X_1-X_2-CO-$ являє собою -Phe-Lys- або -Val-Ala-.

Можуть використовуватися інші комбінації дипептидів, включаючи комбінації, описані в джерелі Dubowchik et al., Bioconjugate Chemistry, 2002, 13, 855-869, включеному до даної заявки за допомогою посилання.

Згідно з одним варіантом реалізації бічний ланцюг амінокислоти являється дериватизованим, якщо це є прийнятним. Наприклад, аміногрупа або карбоксильна група бічного ланцюга амінокислоти може бути дериватизованою.

Згідно з одним варіантом реалізації аміногрупа NH_2 бічного ланцюга амінокислоти, такої як лізин, знаходиться в дериватизованій формі, вибраній із групи, яка складається з NHR та NRR".

Згідно з одним варіантом реалізації карбокси-група $COOH$ бічного ланцюга амінокислоти, такої як аспарагінова кислота, знаходиться в дериватизованій формі, вибраній із групи, яка складається з COOR, $CONH_2$, CONHR та CONRR".

Згідно з одним варіантом реалізації бічний ланцюг амінокислоти являється хімічно захищеним, якщо це є прийнятним. Захисна група бічного ланцюга може являти собою групу, описану нижче відносно групи R^L . Автори даного винаходу виявили, що захищені амінокислотні послідовності піддаються ферментативному розщепленню. Наприклад, було виявлено, що дипептидна послідовність, яка містить бічний ланцюг залишку Lys, захищений Вос-групою, піддається розщепленню катепсином.

Захисні групи бічних ланцюгів амінокислот добре відомі в даній області техніки і описані в каталозі Novabiochem. Додаткові стратегії використання захисних груп представлені в джерелі Protective Groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts.

Можливі захисні групи бічних ланцюгів амінокислот, які містять реакційноздатну функціональну групу у бічному ланцюзі, показані нижче:

Arg: Z, Mtr, Tos;
 Asn: Trt, Xan;
 Asp: Bzl, t-Bu;
 Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
 Glu: Bzl, t-Bu;
 Gln: Trt, Xan;
 His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
 Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;
 Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
 Thr: Bz;
 Trp: Boc;
 Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

Згідно з одним варіантом реалізації захисна група бічного ланцюга обрана таким чином, що вона розташована ортогонально відносно групи, яка являє собою кепуючу групу або її частину (за наявності зазначеної кепуючої групи). Таким чином, видалення захисної групи бічного ланцюга не призводить до видалення кепуючої групи або якої-небудь захисної, функціональної групи, яка є частиною кепуючої групи.

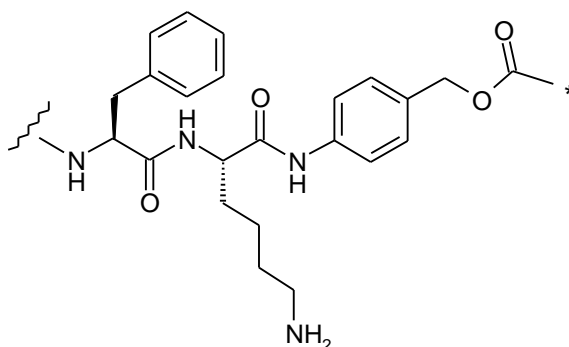
Згідно з іншими варіантами реалізації даного винаходу, вибрані амінокислоти являють собою амінокислоти, які не містять реакційноздатної функціональної групи в бічному ланцюзі. Наприклад, амінокислоти можуть бути обрані з: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro і Val.

Згідно з одним варіантом реалізації дипептид використовується в комбінації з лінкером, що саморозщеплюється. Лінкер, що саморозщеплюється, може бути пов'язаний із $-X_2-$.

Якщо лінкер, що саморозщеплюється, присутній, то $-X_2-$ безпосередньо зв'язаний із зазначеним лінкером, що саморозщеплюється. Переважно група $-X_2-CO-$ зв'язана з Y, де Y являє собою NH, з утворенням, таким чином, групи $-X_2-CO-NH-$.

$-NH-X_1-$ безпосередньо зв'язана з групою A. Зазначена група A може містити функціональну групу CO з утворенням, таким чином, амідного зв'язку з $-X_1-$.

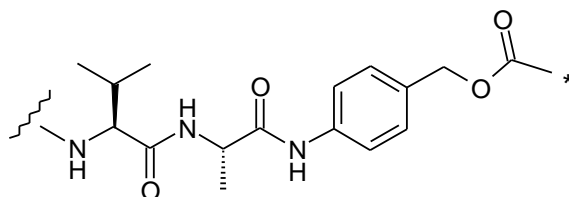
Згідно з одним варіантом реалізації L^1 і L^2 разом із $-OC(=O)-$ складають групу $NH-X_1-X_2-CO-PABC-$. PABC-група безпосередньо зв'язана з положенням N10. Переважно лінкер, що саморозщеплюється, і дипептид разом утворюють групу $-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-$, яка показана нижче:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, а хвиляста лінія позначає місце приєднання до іншої частини лінкера L¹ або місце приєднання до А. Переважно хвиляста лінія позначає місце приєднання до А. Бічний ланцюг амінокислоти Lys може містити захисну групу,

5

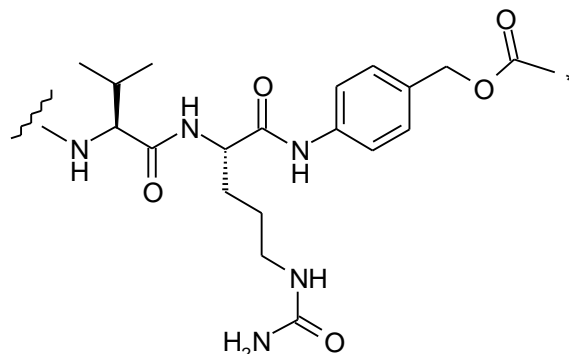
Альтернативно, лінкер, що саморозщеплюється, і дипептид разом утворюють групу -NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-, яка показана нижче:



де зірочка і хвиляста лінія є такими, як визначено вище.

10

Альтернативно, лінкер, що саморозщеплюється, і дипептид разом утворюють групу -NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-, яка показана нижче:



де зірочка і хвиляста лінія є такими, як визначено вище.

15

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, переважним може бути те, що коли PBD/фрагмент лікарського засобу містить незахищений імінний зв'язок, наприклад, при присутності фрагмента В, то лінкер не містить вільної аміногрупи (H₂N-). Таким чином, якщо лінкер має структуру -A-L¹-L²-, то він переважно не містить вільної аміногрупи. Зазначений переважний варіант особливо застосовний, якщо лінкер містить дипептид, наприклад, як L¹; згідно із зазначеним варіантом реалізації переважно одна з двох амінокислот не обрана з лізину.

20

Не обмежуючись будь-якою теорією, автори даного винаходу виявили, що комбінація незахищеного імінного зв'язку в фрагменті лікарського засобу та вільної аміногрупи в лінкері може викликати димеризацію сполуки лікарський засіб-лінкерний фрагмент, яка може перешкоджати кон'югації зазначеної сполуки лікарський засіб-лінкерний фрагмент з антитілом. Перехресне зшивання зазначених груп може посилюватися при наявності вільної аміногрупи, такої як йон амонію (H₃N⁺-), наприклад, при використанні сильної кислоти (наприклад, TFA) для зняття захисту з вільної аміногрупи.

25

Згідно з одним варіантом реалізації А являє собою ковалентний зв'язок. Таким чином, L¹ і агент, який зв'язується з клітинами, зв'язані напряму. Наприклад, якщо L¹ містить безперервну амінокислотну послідовність, то N-кінець зазначеної послідовності може безпосередньо зв'язуватися з агентом, який зв'язується з клітинами.

30

Таким чином, якщо А являє собою ковалентний зв'язок, то зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і L¹ може бути обраний із:

-C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH-,
 -NHC(=O)NH-,
 -C(=O)NHC(=O)-,
 -S-,
 -S-S-,
 -CH₂C(=O)- та
 =N-NH-.

Аміногрупа L¹, яка зв'язується з агентом, що зв'язується з клітинами, може являти собою N-кінець амінокислоти або може походити з аміногрупи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга амінокислоти лізину.

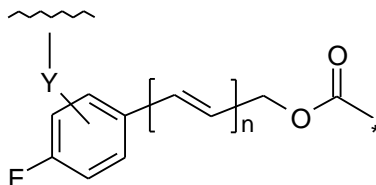
Карбоксильна група L¹, яка зв'язується з агентом, що зв'язується з клітинами, може являти собою C-кінець амінокислоти або може походити з карбоксильної групи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга глютамінової кислоти.

Гідроксильна група L¹, яка зв'язується з агентом, що зв'язується з клітинами, може походити з гідроксильної групи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічної групи амінокислоти серину.

Тіолова група L¹, яка зв'язується з агентом, що зв'язується з клітинами, може походити з тіолової групи бічного ланцюга амінокислоти, наприклад, бічного ланцюга амінокислоти серину.

Коментарі, наведені вище стосовно аміногруп, карбоксильних, гідроксильних і тіолових груп L¹, також застосовні до агента, який зв'язується з клітинами.

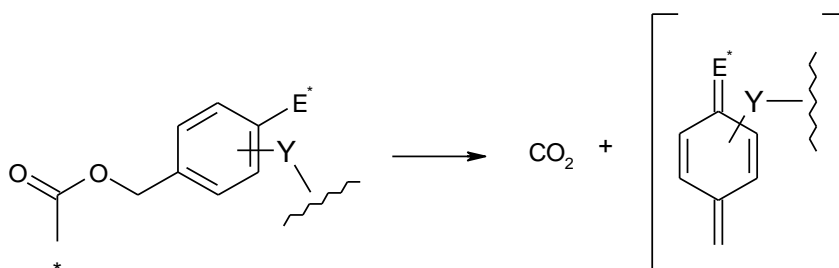
Згідно з одним варіантом реалізації L² разом із -OC(=O)- являє собою:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, хвиляста лінія позначає місце приєднання до L¹, n дорівнює 0-3, Y являє собою ковалентний зв'язок або функціональну групу і E являє собою активовану групу, наприклад, у результаті дії ферментів або світла, з отриманням, таким чином, одиниці, що саморозщеплюється. Феніленове кільце необов'язково додатково містить один, два або три замісники, описані в даному тексті. Згідно з одним варіантом реалізації феніленова група необов'язково додатково містить як замісник галоген, NO₂, R або OR. Переважно n дорівнює 0 або 1, найбільш переважно 0.

E обраний таким чином, що зазначена група є чутливою до активації, наприклад, світлом або під дією ферменту. E може являти собою -NO₂ або глюкуронову кислоту, при цьому перша із зазначених груп може бути чутливою до дії нітроредуктази, а остання – до дії β-глюкуронідази.

Згідно із зазначеним варіантом реалізації, лінкер, що саморозщеплюється, забезпечує вивільнення захищеної сполуки, коли E активований, діючи таким чином, як показано нижче (для n=0):



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, E* являє собою активовану форму E і Y є таким, як описано вище. Зазначені групи мають перевагу, яка полягає в тому, що сайт активації відділений від захищеної сполуки. Як описано вище, феніленова група може бути

необов'язково додатково заміщена.

Група Y може являти собою ковалентний зв'язок з L¹.

Група Y може являти собою функціональну групу, вибрану з:

-C(=O)-
-NH-
-O-
-C(=O)NH-,
-C(=O)O-,
-NHC(=O)-,
-OC(=O)-,
-OC(=O)O-,
-NHC(=O)O-,
-OC(=O)NH-,
-NHC(=O)NH-,
-NHC(=O)NH,
-C(=O)NHC(=O)- та
-S-.

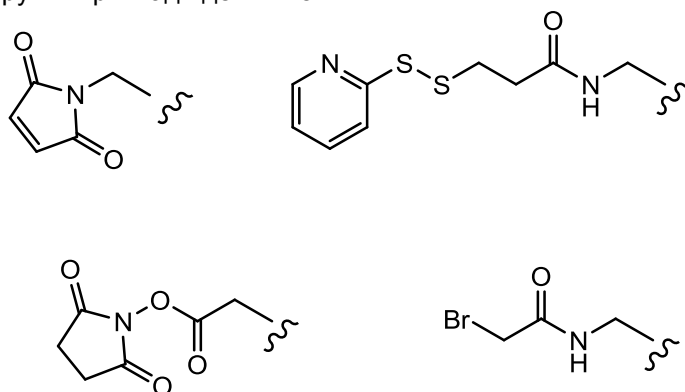
де L¹ являє собою дипептид, Y переважно являє собою -NH- або -C(=O)- з утворенням, таким чином, амідного зв'язку між L¹ і Y. Згідно із зазначеним варіантом реалізації дипептидна послідовність не обов'язково є субстратом для ферментативної активності.

Згідно з іншим варіантом реалізації A являє собою спейсерну групу. Таким чином, L¹ та агент, який зв'язується з клітинами, є зв'язаними не напряму.

L¹ і A можуть бути пов'язані за допомогою зв'язку, вибраного з:

-C(=O)NH-,
-C(=O)O-,
-NHC(=O)-,
-OC(=O)-,
-OC(=O)O-,
-NHC(=O)O-,
-OC(=O)NH- та
-NHC(=O)NH-.

Переважно лінкер містить електрофільну функціональну групу для взаємодії з нуклеофільною функціональною групою агента, який зв'язується з клітинами. Нуклеофільні групи антитіл включають, але не обмежуються ними: (i) N-кінцеві аміногрупи, (ii) аміногрупи бічних ланцюгів, наприклад, лізину, (iii) тіолові групи бічних ланцюгів, наприклад, цистеїну, й (iv) гідроксильні групи цукру або аміногрупи, де антитіло є глікозильованим. Аміногрупи, тіолові й гідроксильні групи є нуклеофільними і здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних фрагментів і лінкерних реагентів, включаючи: (i) малеїмідні групи, (ii) активовані дисульфіди, (iii) активні складні ефіри, такі як складні ефіри NHS (N-гідроксисукцинімід), складні ефіри HOBt (N-гідроксибензотриазолу), галогенформіати й галогенангідриди; (iv) алкіл- і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; й (v) альдегіди, кетони, карбоксильні групи. Приклади деяких із них:

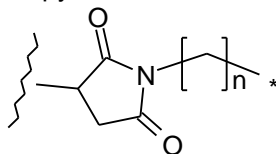


Деякі антитіла містять здатні до відновлення міжланцюгові дисульфіди, тобто цистеїнові мостики. Антитіла можна активувати для кон'югування з лінкерними реагентами шляхом обробки відновлювачем, таким як ДТТ (дитіотреїтол). У результаті кожен цистеїновий мостик теоретично зможе утворити два реакційноздатні тіолові нуклеофіли. До антитіл можна вводити додаткові нуклеофільні групи за допомогою реакції лізінів із 2-імінотіолоном (реагентом

Траута), що призводить до перетворення аміну в тіол. Реакційноздатні тіолові групи можуть вводитися до антитіла (або його фрагмента) шляхом введення одного, двох, трьох, чотирьох або більше цистеїнових залишків (наприклад, при отриманні мутантних антитіл, які містять один або більше чужорідних цистеїнових амінокислотних залишків). У US 7521541 описане отримання антитіла шляхом введення реакційноздатних цистеїнових амінокислот.

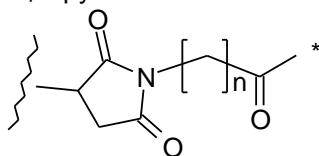
Згідно з деякими варіантами реалізації лінкер містить реакційноздатну нуклеофільну групу, яка є реакційноздатною стосовно електрофільної групи, присутньої в антитілі. Придатні для використання електрофільні групи антитіла включають, але не обмежуються ними, карбонільні групи альдегідів та кетонів. Гетероатом нуклеофільної групи лінкера може взаємодіяти з електрофільною групою антитіла і утворювати ковалентний зв'язок з одиницею антитіла. Придатні для використання нуклеофільні групи лінкера включають, але не обмежуються ними, гідрозид, оксим, аміно, гідроксил, гідразин, тіосемікарбазон, гідразинкарбоксилат і арилгідрозид. Електрофільна група антитіла забезпечує зручний сайт для приєднання лінкера.

Згідно з одним варіантом реалізації група А являє собою:



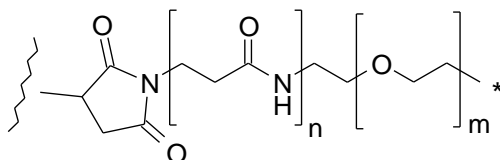
де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, і n дорівнює 0-6. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 5.

Згідно з одним варіантом реалізації група А являє собою:



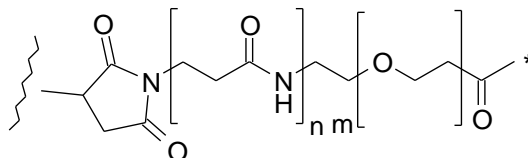
де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, і n дорівнює 0-6. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 5.

Згідно з одним варіантом реалізації група А являє собою:



де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, n дорівнює 0 або 1 і m дорівнює 0-30. Згідно з переважним варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 0-10, 1-8, переважно 4-8 і найбільш переважно 4 або 8. Згідно з іншим варіантом реалізації m дорівнює 10-30 і переважно 20-30. Альтернативно m дорівнює 0-50. Згідно із зазначеним варіантом реалізації m переважно дорівнює 10-40 і n дорівнює 1.

Згідно з одним варіантом реалізації група А являє собою:

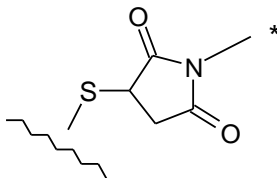


де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, n дорівнює 0 або 1 і m дорівнює 0-30. Згідно з переважним варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 0-10, 1-8, переважно 4-8 і найбільш переважно 4 або 8. Згідно з іншим варіантом реалізації m дорівнює 10-30 і переважно 20-30. Альтернативно, m дорівнює 0-50. Згідно із зазначеним варіантом реалізації m переважно дорівнює 10-40 і n дорівнює 1.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і групою А здійснюється через тіоловий залишок агента, який зв'язується з клітинами, й

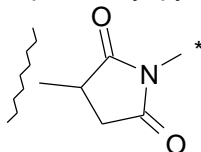
малеїмідну групу А.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і А являє собою:



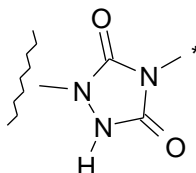
5 де зірочка позначає місце приєднання до іншої частини А, і хвиляста лінія позначає місце приєднання до іншої частини агента, який зв'язується з клітинами. Згідно із зазначеним варіантом реалізації атом S, як правило, належить залишку агента, який зв'язується з клітинами.

10 Згідно з кожним із варіантів реалізації винаходу, зазначених вище, замість групи, отриманої з малеїмїду, можна використовувати альтернативну функціональну групу, показану нижче:



де хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, як показано раніше, а зірочка позначає зв'язок з іншою частиною групи А.

15 Згідно з одним варіантом реалізації група, отримана з малеїмїду, замінена на наступну групу:

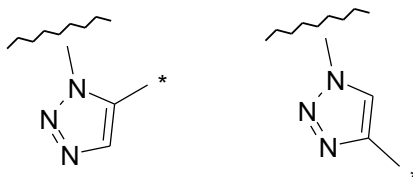


де хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, а зірочка позначає зв'язок з іншою частиною групи А.

20 Згідно з одним варіантом реалізації група, отримана з малеїмїду, замінена на групу, яка необов'язково разом із агентом, який зв'язується з клітинами, обрана з:

- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- 25 -OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH,
- 30 -C(=O)NHC(=O)-,
- S-,
- S-S-,
- CH₂C(=O)-
- C(=O)CH₂-,
- 35 =N-NH- та
- NH-N=.

Згідно з одним варіантом реалізації група, отримана з малеїмїду, замінена на групу, яка необов'язково разом із агентом, який зв'язується з клітинами, обрана з:



40 де хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, або

зв'язок з іншою частиною групи А, а зірочка позначає інше місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, або зв'язок з іншою частиною групи А.

Інші групи, які підходять для зв'язування L^1 із агентом, який зв'язується з клітинами, описані у WO 2005/082023.

5 Група R^{10} походить із групи R^L . Група R^L може бути перетворена в групу R^{10} шляхом зв'язування агента, який зв'язується з клітинами, з функціональною групою R^L . Для перетворення R^L в R^{10} можна використовувати інші способи. Інші способи можуть включати видалення захисних груп при їх наявності або введення відповідної функціональної групи.

Q

10 Згідно з одним варіантом реалізації Q обрана з O, S або N(H).

Переважно Q являє собою O.

R^{11}

Згідно з одним варіантом реалізації R^{11} являє собою H або R, або, якщо Q являє собою O, SO_3M , де M являє собою катіон металу.

15 Згідно з одним варіантом реалізації R^{11} являє собою H.

Згідно з одним варіантом реалізації R^{11} являє собою R.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо Q являє собою O, то R^{11} являє собою SO_3M , де M являє собою катіон металу. Катіон може являти собою Na^+ .

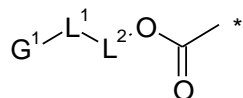
R^L

20 Згідно з одним варіантом реалізації R^L являє собою лінкер для зв'язування з агентом, який зв'язується з клітинами.

Згідно з одним варіантом реалізації лінкер містить функціональну групу для утворення зв'язку з агентом, який зв'язується з клітинами. Дана заявка, зокрема, відноситься до таких груп R^L , які містять карбаматний зв'язок із положенням N10. У даному тексті опис зв'язуючої групи у вищевказаній групі R^{10} також відноситься до її найближчих попередників.

25 R^L відрізняється від групи R^C , яка не підходить для реакції з агентом, який зв'язується з клітинами. Однак, згідно з деякими варіантами реалізації R^C може бути перетворена в групу R^L , наприклад, за допомогою відповідних маніпуляцій із захисними групами та іншими функціональними групами, які являють собою R^C (або утворюють її частину).

30 Згідно з одним варіантом реалізації R^L являє собою наступну групу:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, G^1 являє собою функціональну групу, яка утворює зв'язок із агентом, який зв'язується з клітинами, L^1 являє собою лінкер, L^2 являє собою ковалентний зв'язок або разом із $-OC(=O)-$ утворює лінкер, що саморозщеплюється, а L^1 або L^2 являють собою здатні до розщеплення лінкери.

35 L^1 і L^2 є такими, як визначено вище стосовно R^{10} . Вказівка на зв'язок із групою А може розглядатися в даному тексті як вказівка на зв'язок із групою G^1 .

Згідно з одним варіантом реалізації, коли L^1 містить амінокислоту, бічний ланцюг зазначеної амінокислоти може бути захищеним. Можуть використовуватися будь-які підходящі захисні групи. Згідно з одним варіантом реалізації захисні групи бічного ланцюга видаляються разом із іншими захисними групами в сполучі (при їх наявності). Згідно іншим варіантам реалізації захисні групи можуть бути розташовані ортогонально відносно інших захисних груп у молекулі (при їх наявності).

40 Підходящі захисні групи для бічного ланцюга амінокислот включають групи, описані в каталозі Novabiochem 2006/2007. Захисні групи для використання в катеписин-лабільному лінкері також описані в джерелі Dubowchik et al.

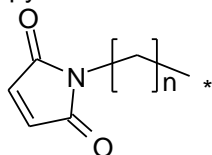
Згідно з певними варіантами реалізації група L^1 включає залишок амінокислоти Lys. Бічний ланцюг зазначеної амінокислоти може містити захисну групу Boc або Alloc. Захисна група Boc є найбільш переважною.

50 Функціональна група G^1 утворює зв'язуючу групу А при її взаємодії з агентом, який зв'язується з клітинами.

Згідно з одним варіантом реалізації функціональна група G^1 являє собою або містить аміногрупу, карбоксильну групу, гідроксильну, тіолову або малеїмідну групу, яка взаємодіє з відповідною групою агента, який зв'язується з клітинами. Згідно з переважним варіантом реалізації G^1 містить малеїмідну групу.

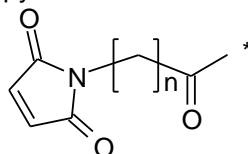
55 Згідно з одним варіантом реалізації група G^1 являє собою алкілмалеїмідну групу. Вказана група є підходящою для реагування з тіоловими групами, зокрема, тіоловими групами цистеїну, присутніми в агенті, який зв'язується з клітинами, наприклад, присутніми в антитілі.

Згідно з одним варіантом реалізації група G^1 являє собою:



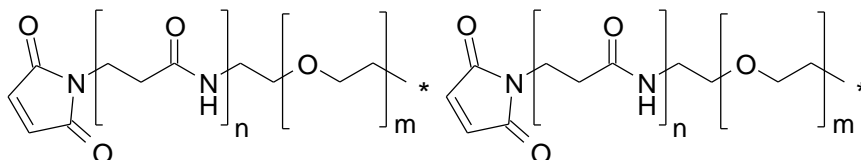
де зірочка позначає місце приєднання до L^1 і n дорівнює 0-6. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 5.

5 Згідно з одним варіантом реалізації група G^1 являє собою:



де зірочка позначає місце приєднання до L^1 і n дорівнює 0-6. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 5.

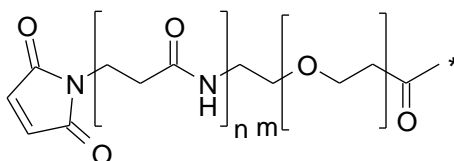
Згідно з одним варіантом реалізації група G^1 являє собою:



10

де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , n дорівнює 0 або 1 і m дорівнює 0-30. Згідно з переважним варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 0-10, 1-2, переважно 4-8 і найбільш переважно 4 або 8. Альтернативно, m дорівнює 0-50. Згідно з зазначеним варіантом реалізації m переважно дорівнює 10-40 і n дорівнює 1.

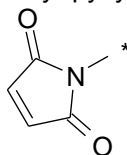
15 Згідно з одним варіантом реалізації група G^1 являє собою:



де зірочка позначає місце приєднання до L^1 , n дорівнює 0 або 1 і m дорівнює 0-30. Згідно з переважним варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 0-10, 1-8, переважно 4-8 і найбільш переважно 4 або 8. Альтернативно, m дорівнює 0-50. Згідно із зазначеним варіантом реалізації m переважно дорівнює 10-40 і n дорівнює 1.

20

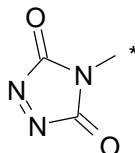
Згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, замість малеїмідної групи можна використовувати альтернативну функціональну групу, показану нижче:



де зірочка позначає зв'язок із іншою частиною групи G .

25

Згідно з одним варіантом реалізації винаходу група, яка має походження з малеїмиду, заміненена на наступну групу:



де зірочка позначає зв'язок із іншою частиною групи G .

Згідно з одним варіантом реалізації малеїмідна група заміненена на групу, вибрану з:

30

-C(=O)OH,
-OH,
-NH₂,

-SH,
 -C(=O)CH₂D, де D являє собою Cl, Br або I,
 -CHO,
 -NHNH₂
 -C≡CH та
 -N₃ (азид).

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою -NH₂, -NHMe, -COOH, -OH або -SH.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою -NH₂ або -NHMe. Будь-яка з вказаних група може являти собою N-кінець амінокислотної послідовності L¹.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою -NH₂ і L¹ являє собою амінокислотну послідовність -X₁-X₂-, як визначено вище стосовно R¹⁰.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою COOH. Зазначена група може являти собою C кінець амінокислотної послідовності L¹.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою OH.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою SH.

Група G¹ може бути перетворена з однієї функціональної групи в іншу. Згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою -NH₂. Зазначена група піддається перетворенню в іншу групу G¹, яка містить малеїмідну групу. Наприклад, група -NH₂ може взаємодіяти з кислотами або активованою кислотою (наприклад, N-сукцинімідною формою) зазначених груп G¹ показаних вище, які містять малеїмід, .

Група G¹, таким чином, може перетворюватися в функціональну групу, яка є більш підходящою для взаємодії з агентом, який зв'язується з клітинами.

Згідно з іншими варіантами реалізації, R^L являє собою групу, яка являє собою попередник лінкера, представленого з функціональною групою.

Як зазначено вище, згідно з одним варіантом реалізації, якщо присутній L¹, то G¹ являє собою -NH₂, -NHMe, -COOH, -OH або -SH. Згідно з іншим варіантом реалізації вказані групи використовуються в хімічно захищеній формі. Хімічно захищена форма, таким чином, є попередником лінкера, який містить функціональну групу.

Згідно з одним варіантом реалізації, G¹ являє собою -NH₂ в хімічно захищеній формі. Зазначена група може містити карбаматну захисну групу. Карбаматна захисна група може бути вибрана з групи, яка складається з:

Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Cbz і PNZ.

Переважно, якщо G¹ являє собою -NH₂, то він містить захисну групу Alloc або Fmoc.

Згідно з одним варіантом реалізації, якщо G¹ являє собою -NH₂, то він містить захисну групу Fmoc.

Згідно з одним варіантом реалізації, зазначена захисна група являє собою таку ж карбаматну захисну групу, як карбаматна захисна група для кепуючої групи.

Згідно з одним варіантом реалізації, зазначена захисна група не являє собою таку ж карбаматну захисну групу, як карбаматна захисна група для кепуючої групи. Згідно із зазначеним варіантом реалізації, переважно, що зазначена захисна група видалається в умовах, у яких карбаматна захисна група кепуючої групи не видалається.

Хімічну захисну групу можна видалати з отриманням функціональної групи, яка утворює зв'язок із агентом, який зв'язується з клітинами. Зазначена функціональна група потім необов'язково може бути перетворена в іншу функціональну групу, як описано вище.

Згідно з одним варіантом реалізації, активна група являє собою амін. Зазначений амін переважно являє собою N-кінцевий амін пептиду і може являти собою N-кінцевий амін переважних дипептидів згідно з даним винаходом.

Активна група може піддаватися реакції, яка призводить до отримання функціональної групи, схильної утворювати зв'язок із агентом, який зв'язується з клітинами.

Згідно з іншими варіантами реалізації, лінкер являє собою попередник лінкера, який містить активну групу. Згідно із зазначеним варіантом реалізації, лінкер містить активну групу, захищену за допомогою захисної групи. Захисна група може бути видалена з отриманням лінкера, який містить активну групу.

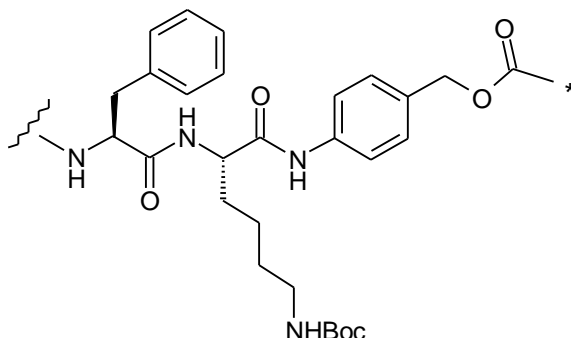
Коли активна група являє собою амін, захисна група може являти собою захисну групу для аміногрупи, таку як групи, описані в джерелі Green and Wuts.

Захисна група переважно розташована ортогонально відносно інших захисних груп, при їх наявності, у групі R^L.

Згідно з одним варіантом реалізації, захисна група розташована ортогонально відносно кепуючої групи. Таким чином, захисна група активної групи здатна видалатися при збереженні

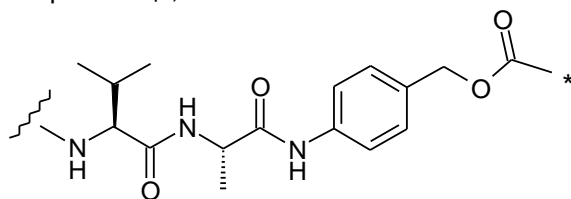
кепуючої групи. Згідно з іншими варіантами реалізації, захисна група та кепуюча група видаляються в тих же умовах, які використовуються для видалення кепуючої групи.

Згідно з одним варіантом реалізації, R^L являє собою:

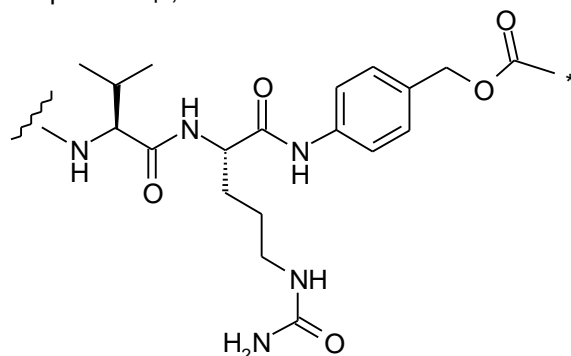


- 5 де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, а хвиляста лінія позначає місце приєднання до іншої частини лінкера L^1 або місце приєднання до G^1 . Переважно хвиляста лінія позначає місце приєднання до G^1 .

Згідно з одним варіантом реалізації, R^L являє собою:



- 10 де зірочка і хвиляста лінія є такими, як визначено вище.
Згідно з одним варіантом реалізації, R^L являє собою:



де зірочка і хвиляста лінія є такими, як визначено вище.

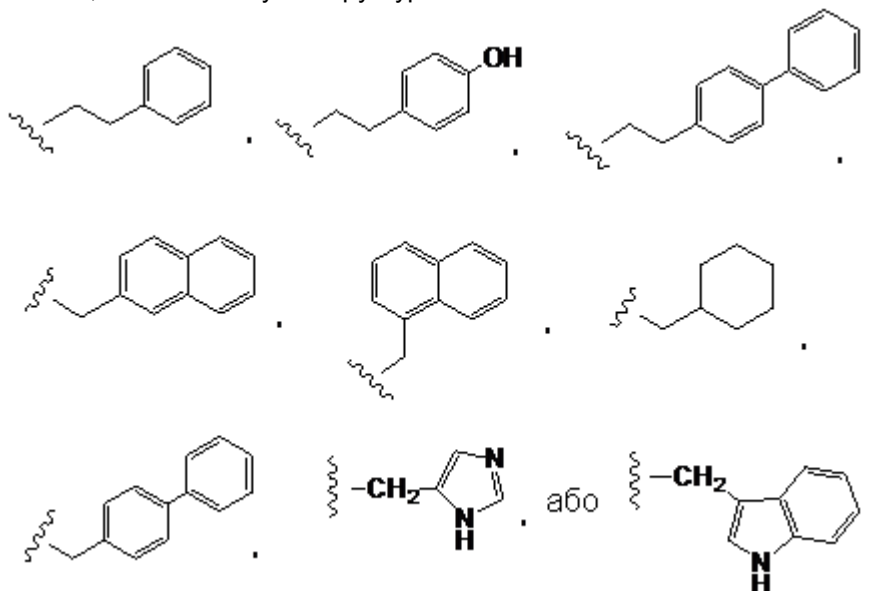
- 15 Інші функціональні групи, які підходять для використання, для формування зв'язку між L^1 і агентом, який зв'язується з клітинами, описані у WO 2005/082023.

- Лінкери можуть містити здатні до розщеплення під дією протеази пептидні фрагменти, які містять одну або більше амінокислотних ланок. Пептидні лінкерні реагенти можуть бути отримані за допомогою способів твердофазного або рідкофазного синтезу (E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press), які добре відомі в області пептидної хімії, включаючи хімію t-BOC (Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) і хімію Fmoc / HBTU (Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214), на автоматичному синтезаторі, такому як синтезатор пептидів Rainin Symphony (Protein Technologies, Inc., Туксон, Арізона) або Model 433 (Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія).

- 25 Приклади амінокислотних лінкерів включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Приклади дипептидів включають: валін-цитрулін (vc або val-cit), аланін-фенілаланін (af або ala-phe). Приклади трипептидів включають: гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Амінокислотні залишки, які містять амінокислотний лінкерний компонент, включають залишки природних амінокислот, а також мінерних амінокислот і неприродних аналогів амінокислот, таких як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути отримані і можуть бути певними ферментами за селективністю для ферментативного розщеплення, наприклад, пухлиноасоційованою протеазою, катепсином B, C і

D або протеазою плазмінном.

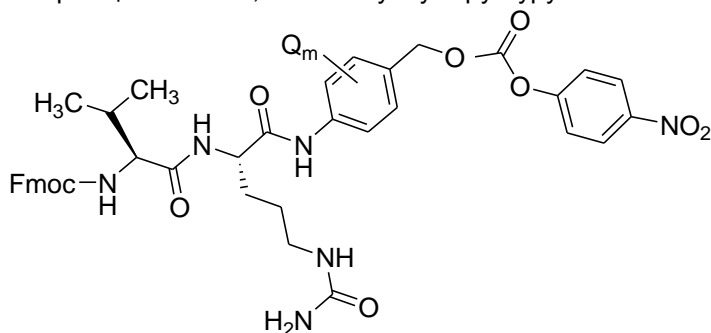
- Бічні ланцюги амінокислот включають бічні ланцюги природних амінокислот, а також мінорних амінокислот і неприродних аналогів амінокислот, таких як цитрулін. Бічні ланцюги амінокислот включають водень, метил, ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, бензил, п-гідроксибензил, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил, а також наступні структури:



- Коли бічний ланцюг амінокислоти містить більше одного атома водню (гліцин), атом вуглецю, до якого приєднаний зазначений бічний ланцюг амінокислоти, є хіральним. Кожний атом вуглецю, до якого приєднаний бічний ланцюг амінокислоти, незалежно знаходиться в (S) чи (R) конфігурації або утворює рацемічну суміш. Сполука лікарський засіб-лінкерний реагент, таким чином, може знаходитися у вигляді енантімерно чистої, рацемічної або діастереомерної суміші.

- Згідно з прикладами варіантів реалізації бічні ланцюги амінокислот вибрані з бічних ланцюгів природних і неприродних амінокислот, включаючи аланін, 2-аміно-2-циклогексаноївову кислоту, 2-аміно-2-фенілоївову кислоту, аргінін, аспарагін, аспарагінову кислоту, цистеїн, глутамін, глутамінову кислоту, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, норлейцин, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, тирозин, валін, γ-аміноолійну кислоту, α,α-диметил-γ-аміноолійну кислоту, β,β-диметил-γ-аміноолійну кислоту, орнітин та цитрулін (Cit).

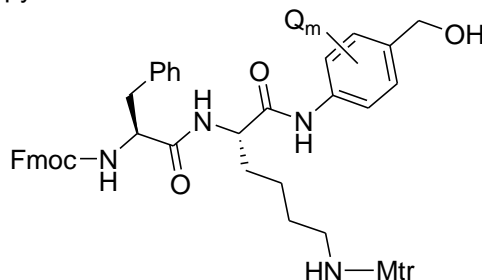
- Приклад дипептидного лінкерного реагента валін-цитрулін (val-cit або vc), придатного для створення інтермедіату лінкер-фрагменту PBD лікарського засобу для кон'югування з агентом, який зв'язується з клітинами, наприклад, антитілом, що містить пара-амінобензилкарбамоїльний (PAB) спейсер, що саморозщеплюється, має наступну структуру:



- де Q являє собою C₁-C₈ алкіл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -галоген, -NO₂ або -CN; і m дорівнює цілому числу в діапазоні від 0 до 4.

Приклад дипептидного лінкерного реагента phe-lys(Mtr), який містить п-амінобензильну групу, може бути отриманий відповідно до джерела Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters,

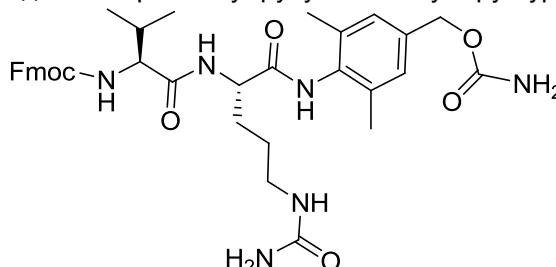
38:5257-60 і має таку структуру:



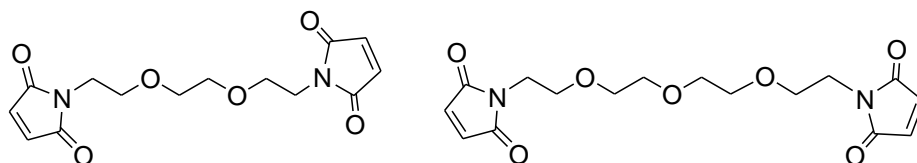
де Mtr являє собою моно-4-метокситритил, Q являє собою C₁-C₈ алкіл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -галоген, -NO₂ або -CN; і m дорівнює цілому числу в діапазоні від 0 до 4.

- 5 Лінкер PAB, що саморозщеплюється, (пара-амінобензилоксикарбоніл) приєднує фрагмент лікарського засобу до антитіла в кон'югаті антитіло-лікарський засіб (Carl et al (1981) J. Med. Chem. 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; 10 US20040121940; WO2004/032828). Інші приклади спейсерів, що саморозщеплюються, крім PAB, включають, але не обмежуються ними: (i) ароматичні сполуки, які за електронною будовою подібні до PAB-групи, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), тiazoli (US 7375078), безліч послідовно з'єднаних PAB ланок (de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830); і орто- або пара-амінобензилацеталі та (ii) гомологічні 15 стирольні аналоги PAB (US 7223837). Можуть використовуватися спейсери, які піддаються циклізації при гідролізі амідного зв'язку, такі як заміщені й незаміщені аміді 4-аміноолійної кислоти (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), заміщені відповідним чином біцикло[2.2.1] і біцикло[2.2.2] кільцеві системи (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) і аміді 2-амінофенілпропіонової кислоти (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Здатні до 20 елімінування амін-вмісні лікарські засоби із заміщенням гліцином (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447) також є прикладами спейсерів, що саморозщеплюються, застосовних у ADC.

Згідно з одним варіантом реалізації реагент, який являє собою дипептидний PAB аналог валін-цитрулін, містить 2,6-диметилфенільну групу і має таку структуру:



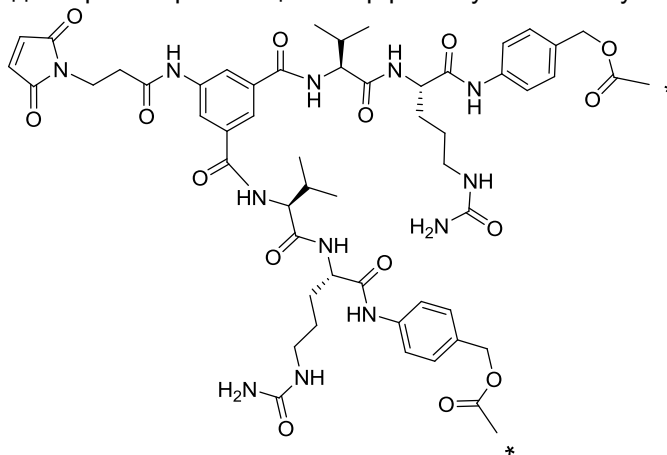
- 25 Лінкерні реагенти, придатні для одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб згідно з даним винаходом включають, але не обмежуються ними: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC та сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), та біс-малеїмідні реагенти: DTME, BMB, BMDB, BMH, 30 BMOE, 1,8-біс-малеїмідодидиетилгліколь (BM(PEO)₂) і 1,11-біс-малеїмідотриетилгліколь (BM(PEO)₃), які є комерційно доступними від компанії Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, Іллінойс, США та інших постачальників реагентів. Біс-малеїмідні реагенти забезпечують послідовне або паралельне приєднання вільної тіолової групи цистеїнового залишку антитіла до фрагменту лікарського засобу, який містить тіол, мітки або лінкерного 35 інтермедиату. Інші функціональні групи, крім малеїмїду, які є реакційноздатними стосовно тіолової групи антитіла, PBD фрагменту лікарського засобу або лінкерного інтермедиату, включають йодацетамід, бромацетамід, вінілпіридин, дисульфід, піридилдисульфід, ізоціанат та ізотіоціанат.

BM(PEO)₂BM(PEO)₃

Інші варіанти лінкерних реагентів являють собою: N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP), N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонат (SPDP, Carlsson et al (1978) Biochem. J. 173: 723-737), (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоєфірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) та біс-активні фтор-вмісні сполуки (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Придатні для застосування лінкерні реагенти також можуть бути отримані з інших комерційних джерел, таких як Molecular Biosciences Inc. (Боулдер, Колорадо, США), або отримані відповідно до способів, описаних у джерелі Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US 2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 та WO 04/032828.

Лінкер може являти собою лінкер розгалуженого типу для ковалентного зв'язування більш, ніж одного фрагмента лікарського засобу через розгалужений мультифункціональний лінкерний фрагмент із антитілом (US 2006/116422; US 2005/271615; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. +42:4490-4494; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499; Shamis et al (2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731; Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King et al (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Розгалужені лінкери можуть підвищувати молярне співвідношення лікарського засобу і антитіла, тобто навантаження, яке пов'язано з активністю ADC. Таким чином, коли антитіло має тільки одну реакційноздатну тіолову групу цистеїну, множина фрагментів лікарського засобу може бути приєднана через розгалужений або дендритний лінкер.

У одному з прикладів варіантів реалізації лінкер розгалуженого типу має наступну структуру:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10 PBD фрагменту.

Агент, який зв'язується з клітинами

Агент, який зв'язується з клітинами, може бути будь-якого типу і включає пептиди та непептиди. Непептиди можуть включати антитіла або фрагмент антитіла, який містить щонайменше один сайт зв'язування, лімфокіни, гормони, фактори росту, молекули переносу біогенних речовин або будь-які інші молекули або речовини, які зв'язуються з клітинами.

Термін "антитіло" у даній заявці використовується в широкому сенсі й зокрема включає моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, димери, мультимери, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл, за умови, що вони проявляють бажану біологічну активність (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Антитіла можуть бути мишачими, людськими, гуманізованими, гібридними або такими, що походять від інших видів. Антитіло являє собою білок, який продукується клітинами імунної системи, здатний розпізнавати й зв'язуватися зі специфічним антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антиген-

мішень в цілому має численні сайти зв'язування, також називані епітопами, які розпізнають ділянки CDR безлічі антитіл. Кожне антитіло, яке специфічно зв'язується з окремим епітопом, має структуру, що відрізняється. Таким чином, один антиген може мати більше одного антитіла, що йому відповідає. Антитіло включає повнорозмірну молекулу імуноглобуліну або імунологічно активну частину повнорозмірної молекули імуноглобуліну, тобто молекулу, яка містить антиген-зв'язуючий сайт, який імуноспецифічно зв'язується з антигеном мішені, що представляє інтерес, або його частиною, при цьому зазначені мішені включають, але не обмежуються ними, ракові клітини або клітини, які продукують аутоімунні антитіла, асоційовані з аутоімунним захворюванням. Імуноглобулін може відноситися до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD та IgA), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2) або підкласу молекул імуноглобулінів. Імуноглобуліни можуть мати різне походження, включаючи імуноглобуліни людини, миші або кролика.

"Фрагменти антитіл" включають частину повнорозмірного антитіла, в цілому, його антиген-зв'язуючу або варіабельну область. Приклади фрагментів антитіл включають Fab, Fab', F(ab')₂ та Fv-фрагменти; діатіла; лінійні антитіла; фрагменти, отримані з Fab-експресійної бібліотеки, антидіотипічні (анти-Id) антитіла, CDR (що визначає комплементарну область) і фрагменти будь-якого із зазначених вище фрагментів, що зв'язуються з епітопом, які імуноспецифічно зв'язуються з антигенами ракових клітин, вірусними антигенами або мікробними антигенами; молекули одноланцюгових антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

У даному описі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що містять зазначену популяцію, є ідентичними за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми в мінімальній кількості. Моноклональні антитіла є високо специфічними, при цьому вони спрямовані проти одного антигенного сайту. Більше того, на відміну від складів поліклональних антитіл, які містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Окрім їхньої специфічності, перевагою моноклональних антитіл є також можливість їх синтезу без забруднення іншими антитілами. Визначення "моноклональне" вказує характеристику антитіла, отриманого з по суті гомогенної популяції антитіл, при цьому зазначене визначення не має на увазі продукцію антитіл яким-небудь визначеним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даного винаходу можуть бути отримані за допомогою гібридомних способів, вперше описаних у джерелі Kohler et al (1975) Nature 256:495, або можуть бути отримані за допомогою способів рекомбінації ДНК (див. US 4816567). Моноклональні антитіла також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл з використанням методів, описаних у джерелі Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

У даному описі моноклональні антитіла зокрема включають "гібридні" антитіла, в яких частина важкого і/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям у антитілах, які отримані з певних видів або належать певному класу чи підкласу антитіл, тоді як інша частина ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям антитіл, які походять із іншого виду або належать іншому класу чи підкласу антитіл, а також фрагментам таких антитіл, за умови, що вони проявляють бажану біологічну активність (US 4816567; та Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Гібридні антитіла включають "приматизовані" антитіла, які містять варіабельні доменні антиген-зв'язуючі послідовності, що походять із послідовностей константної області примата, який не являє собою людину (наприклад, мартішкових або людиноподібних мавп), і людини.

У даному описі "інтактне антитіло" являє собою антитіло, яке містить домени VL і VH, а також константний домен легкого ланцюга (CL) і константні домени важкого ланцюга CH1, CH2 і CH3. Константні домени можуть являти собою константні домени нативних послідовностей (наприклад, константні домени нативної послідовності людини) або варіантних амінокислотних послідовностей. Інтактне антитіло може мати одну або більше "ефекторних функцій", які відносяться до біологічних активностей, властивих Fc-області (нативної послідовності Fc-області або варіантної амінокислотної послідовності Fc-області) антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають C1q-зв'язування; залежну від комплексу цитотоксичність; Fc-рецепторне зв'язування; антитіло-залежну опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз і негативну регуляцію рецепторів клітинної поверхні, таких як B-клітинний рецептор і BCR.

У залежності від амінокислотної послідовності константного домену їх важких ланцюгів інтактні антитіла можуть бути віднесені до різних "класів". Існує п'ять основних класів інтактних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, і деякі з зазначених класів можуть бути додатково розділені на

"підкласи" (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA і IgA2. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам антитіл, називаються α , δ , ϵ , γ і μ відповідно. Субодинична структура і тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів є добре відомими.

Приклади агентів, які зв'язуються з клітинами, включають агенти, описані для застосування у WO 2007/085930, яка включена до даної заявки.

Агент, який зв'язується з клітинами, може являти собою або включати поліпептид. Зазначений поліпептид може являти собою циклічний поліпептид. Агент, який зв'язується з клітинами, може являти собою антитіло. Таким чином, згідно з одним варіантом реалізації даного винаходу запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC).

Навантаження лікарського засобу

Навантаження лікарського засобу являє собою середню кількість PBD лікарського засобу на антитіло. Навантаження лікарського засобу може варіюватися від 1 до 8 фрагментів лікарського засобу (D) на антитіло (Ab), тобто при цьому 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8 фрагментів лікарського засобу ковалентно зв'язані з антитілом. Композиції ADC включають сукупність антитіл, кон'югованих із фрагментами лікарських засобів у кількості від 1 до 8. Середнє число лікарських засобів на антитіло в композиціях ADC, отриманих у результаті реакцій кон'югації, може бути визначене стандартними способами, такими як мас-спектрометрія, твердофазний ІФА-аналіз (ELISA), електрофорез та ВЕРХ. Також можна визначити кількісний розподіл ADC в одиницях р. Середнє значення р у конкретній композиції ADC можна визначити за допомогою ELISA (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однак розподіл значень р (навантаження лікарського засобу) неможливо визначити внаслідок зв'язування антитіло-антиген й межі виявлення ELISA. Також за допомогою ELISA при використанні методу для виявлення кон'югату антитіло-лікарський засіб не можна визначити, в яких сайтах фрагменти лікарського засобу приєднані до антитіла, наприклад, до фрагментів важких ланцюгів або легких ланцюгів, або певних амінокислотних залишків. У деяких прикладах, розділення, очищення та характеристика однорідних ADC, де р приймає певне значення, може досягатися такими способами, як зворотно-фазова ВЕРХ або електрофорез.

Для деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб р може обмежуватися числом сайтів приєднання на антитілі. Наприклад, антитіло може містити одну чи декілька тілових груп цистеїну або може містити лише одну чи декілька досить реакційноздатних тілових груп, через які може приєднуватися лінкер. Більш високе навантаження лікарського засобу, наприклад, $p > 5$, може викликати агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату проникності в клітини певних кон'югатів антитіло-лікарський засіб. Як правило, під час реакції кон'югації з антитілом зв'язується число фрагментів лікарського засобу, менше за теоретичний максимум. Антитіло може містити, наприклад, багато залишків лізину, які не взаємодіють із інтермедіатом лікарський засіб-лінкер (D-L) або лінкерним реагентом. Тільки найбільш реакційноздатні групи лізину можуть реагувати з реакційноздатним стосовно амінів лінкерним реагентом. Подібним чином, тільки найбільш реакційноздатні тілові групи цистеїну можуть реагувати з реакційноздатним стосовно тілових груп-лінкерним реагентом. У цілому, антитіла містять небагато, якщо взагалі містять, вільних і реакційноздатних тілових груп цистеїну, які можуть зв'язуватися з фрагментом лікарського засобу. Більшість тілових груп залишків цистеїну в антитілах у зазначених сполуках існують у вигляді дисульфідних мостиків і повинні відновлюватися за допомогою відновників, таких як дитіотреїтол (ДТТ) або ТСЕР, у частково або повністю відновлювальних умовах. Навантаження (відношення лікарський засіб/антитіло) в ADC може контролюватися кількома різними способами, включаючи: (i) обмеження молярного надлишку інтермедіату лікарський засіб-лінкер (D-L) або лінкерного реагента відносно антитіла, (ii) обмеження часу або температури реакції кон'югації, й (iii) часткові або обмежуючі відновні умови для модифікації тілових груп цистеїну.

У реакційноздатних сайтах антитіла можуть бути сконструйовані цистеїнові амінокислоти, які не утворюють міжланцюгових чи міжмолекулярних дисульфідних зв'язків (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26 (8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114 (13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249). Отримані тілові групи цистеїну можуть взаємодіяти з лінкерними реагентами або сполуками лікарський засіб-лінкерний реагент згідно з даним винаходом, які містять реакційноздатні стосовно тілових груп електрофільні групи, такі як малеїмідна або альфа-галогенаміди, з утворенням ADC зі сконструйованими на основі цистеїну антитілами і фрагментами PBD лікарського засобу. Положення фрагмента лікарського засобу, таким чином, може плануватися, контролюватися і бути відомим. Навантаження лікарського засобу можна контролювати, оскільки сконструйовані тілові групи цистеїну, як правило, взаємодіють із реакційноздатними стосовно тілових груп лінкерними реагентами або сполуками лікарський засіб-лінкерний реагент із високою ефективністю. Конструювання антитіла IgG з введенням

амінокислоти цистеїну шляхом заміщення одного сайту у важкому або легкому ланцюзі призводить до появи двох нових цистеїнів у симетричному антитілі. Можна досягти навантаження лікарського засобу зі значенням близько 2 і відносної однорідності продукту кон'югації ADC.

Коли більше однієї нуклеофільної або електрофільної групи антитіла реагують із інтермедіатом лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом з подальшою взаємодією з фрагментом лікарського засобу, отриманий продукт являє собою суміш ADC сполук із розподілом фрагментів лікарського засобу, приєднаних до антитіла, наприклад, 1, 2, 3 і т.д. За допомогою методів рідинної хроматографії, таких як полімерна зворотно-фазова хроматографія (PLRP) і хроматографія гідрофобної взаємодії (HIC), можна розділяти сполуки в суміші відповідно до навантаження лікарського засобу. Можуть бути виділені композиції ADC з одним значенням навантаження лікарського засобу (p), проте зазначені композиції ADC з одним значенням навантаження можуть все ще являти собою гетерогенні суміші, оскільки фрагменти лікарського засобу можуть приєднуватися за допомогою лінкера до різних сайтів антитіла.

Таким чином, композиції кон'югату антитіло-лікарський засіб згідно з даним винаходом включають суміші сполук антитіло-лікарський засіб, які являють собою кон'югати, де антитіло містить один або більше фрагментів PBD лікарського засобу і де фрагменти лікарського засобу можуть бути приєднані до антитіла через зв'язування з різними амінокислотними залишками.

Згідно з одним варіантом реалізації середня кількість мономерних або димерних піролбензодіазепінових груп у агенті, який зв'язується з клітинами, знаходиться в діапазоні від 1 до 20. Згідно з деякими варіантами реалізації діапазон вибраний із від 1 до 8, від 2 до 8, від 2 до 6, від 2 до 4 та від 4 до 8.

Згідно з деякими варіантами реалізації на один агент, який зв'язується з клітинами, припадає одна мономерна або димерна піролбензодіазепінова група.

Пептиди

Згідно з одним варіантом реалізації агент, який зв'язується з клітинами, являє собою лінійний чи циклічний пептид, що містить 4-20, переважно 6-20 безперервно розташованих амінокислотних залишків. Згідно із зазначеним варіантом реалізації один агент, який зв'язується з клітинами, переважно зв'язаний із однією мономерною або димерною піролбензодіазепіновою сполукою.

Згідно з одним варіантом реалізації агент, який зв'язується з клітинами, містить пептид, який зв'язується з інтегрином $\alpha_v\beta_6$. Зазначений пептид може бути селективним стосовно $\alpha_v\beta_6$ в порівнянні з XYS .

Згідно з одним варіантом реалізації агент, який зв'язується з клітинами, містить поліпептид A20FMDV-Cys. Зазначений поліпептид A20FMDV-Cys має послідовність: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Альтернативно можуть використовуватися інші послідовності A20FMDV-Cys, в яких один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять чи десять амінокислотних залишків заміщені іншими амінокислотними залишками.

Згідно з одним варіантом реалізації антитіло являє собою моноклональне антитіло; гібридне антитіло; гуманізоване антитіло; повністю гуманізоване антитіло або одноланцюгове антитіло. Згідно з одним варіантом реалізації антитіло являє собою фрагмент одного із зазначених антитіл, який має біологічну активність. Приклади зазначених фрагментів включають Fab-, Fab'-, F(ab')₂ - та Fv-фрагменти.

Згідно зазначеним варіантам реалізації кожне антитіло може бути пов'язане з однією або декількома мономерними або димерними піролбензодіазепіновими групами. Переважні співвідношення піролбензодіазепіну до агента, який зв'язується з клітинами, наведені вище.

Антитіло може являти собою доменне антитіло (DAB).

Згідно з одним варіантом реалізації антитіло являє собою моноклональне антитіло.

Антитіла для застосування згідно з даним винаходом включають антитіла, описані у WO 2005/082023, яка включена до даної заявки. Зокрема, переважними є антитіла до пухлиноасоційованих антигенів. Приклади зазначених антигенів, відомих у даній області техніки, включають, без обмеження, зазначені пухлиноасоційовані антигени, наведені у WO 2005/082023. Див, наприклад, стор. 41-55.

Кон'югати згідно з даним винаходом розроблені для спрямованого впливу на пухлинні клітини через антигени їхньої клітинної поверхні. Антигени зазвичай являють собою антигени поверхні здорових клітин, в разі розладів спостерігається їх експресія або гіперекспресія. У ідеальному випадку антиген-мішень експресується тільки на проліферативних клітинах (переважно пухлинних клітинах), що, однак, рідко спостерігається в дійсності. У результаті антигени-мішені зазвичай вибирають за різницею в рівні експресії між проліферативними та здоровими тканинами.

Були створені антитіла, специфічно спрямовані проти антигенів, зв'язаних із пухлинами, які включають:

крипто, CD30, CD19, CD33, глікопротеїн NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD22 (Siglec2), CD33 (Siglec3), CD79, CD138, PSCA, PSMA (специфічний мембранний антиген клітин передміхурової залози), BCMA, CD20, CD70, E-селектин, EphB2, меланотрансферин, Muc16 та TMEFF2.

Пухлиноасоційовані антигени (tumor-associated antigens, TAA) відомі в даній області техніки і можуть бути отримані для застосування для створення антитіл з використанням способів та відомостей, добре відомих у даній області техніки. У спробах пошуку ефективних клітинних мішеней для діагностики та терапії раку дослідники намагалися ідентифікувати трансмембранні або інші пухлиноасоційовані поліпептиди, які специфічно експресуються на поверхні одного (або більше) визначеного типу (типів) ракових клітин у порівнянні з одним (або більше) типом (типами) здорових неракових клітин. Такі пухлиноасоційовані поліпептиди часто експресуються на поверхні ракових клітин в значно більшій кількості в порівнянні з нераковими клітинами. Ідентифікація таких поліпептидів пухлиноасоційованих антигенів клітинної поверхні дала можливість специфічно направлено впливати на ракові клітини, викликаючи їх загибель, за допомогою терапії на основі антитіл.

Приклади TAA включають, але не обмежуються ними, TAA (1)-(36), перераховані нижче. Для зручності, інформація щодо вказаних антигенів, усі з яких відомі в даній області техніки, представлена нижче і включає назви, альтернативні назви, коди доступу в базі даних GenBank і основне посилання (посилання), відповідно до правил ідентифікації послідовностей нуклеїнових кислот і білків Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Послідовності нуклеїнових кислот і білків, що відповідають TAA (1)-(36), можна знайти в загальнодоступних базах даних, таких як GenBank. Пухлиноасоційовані антигени, проти яких направлено діють антитіла, включають усі варіанти амінокислотних послідовностей та ізоформи, що мають щонайменше приблизно 70 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичності за послідовністю в порівнянні з послідовностями, ідентифікованими в цитованих посиланнях, або проявляють по суті такі ж біологічні властивості чи характеристики, як TAA, що містять послідовності, наведені в цитованих посиланнях. Наприклад, TAA, що містить варіантну послідовність, в цілому здатний специфічно зв'язуватися з антитілом, яке специфічно зв'язується з TAA з відповідною зазначеною послідовністю. Послідовності й опис, наведені в посиланні, цитованому в даній заявці, повністю включені до даної заявки допомогою посилання.

ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНІ АНТИГЕНИ (1)-(36):

(1) BMPR1B (рецептор кісткового морфогенетичного білка, тип IB, код доступу GenBank NM_001203) ten Dijke, P., et al Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO2004/063362 (п. 2); WO2003/042661 (п. 12); US2003/134790-A1 (стор. 38-39); WO2002/102235 (п. 13; стор. 296); WO2003/055443 (стор. 91-92); WO2002/99122 (Приклад 2; стор. 528-530); WO2003/029421 (п. 6); WO2003/024392 (п. 2; Фіг. 112); WO2002/98358 (п. 1; стор. 183); WO2002/54940 (стор. 100-101); WO2002/59377 (стор. 349-350); WO2002/30268 (п. 27; стор. 376); WO2001/48204 (Приклад; Фіг. 4); NP_001194 рецептор кісткового морфогенетичного білка, тип IB/pid=NP_001194.1. Перехресні посилання: MIM: 603248; NP_001194.1; AY065994;

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, код доступу GenBank NM_003486) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, HW, et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273; WO2004/048938 (Приклад 2); WO2004/032842 (Приклад IV); WO2003/042661 (п. 12); WO2003/016475 (п. 1); WO2002/78524 (Приклад 2); WO2002/99074 (п. 19; стор. 127-129); WO2002/86443 (п. 27; стор. 222, 393); WO2003/003906 (п. 10; стор. 293); WO2002/64798 (п. 33; стор. 93-95); WO2000/14228 (п. 5; стор. 133-136); US2003/224454 (фіг. 3); WO2003/025138 (п. 12; стор. 150); NP_003477 сімейство носіїв розчинених агентів 7 (транспортер катіонних амінокислот, у+ система), член 5/pid=NP_003477.3 – Homo sapiens; Перехресні посилання: MIM: 600182; NP_003477.3; NM_015923;

(3) STEAP1 (епітеліальний антиген передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами, код доступу GenBank NM_012449); Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, RS, et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528; WO2004/065577 (п. 6); WO2004/027049 (фіг. 1L); EP1394274 (Приклад 11); WO2004/016225 (п. 2); WO2003/042661 (п. 12); US2003/157089 (Приклад 5); US2003/185830 (Приклад 5); US2003/064397 (фіг. 2); WO2002/89747 (Приклад 5; стор. 618-619); WO2003/022995 (Приклад 9; Фіг. 13A, Приклад 53; стор. 173, Приклад 2; Фіг. 2A); NP_036581 епітеліальний антиген передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами; перехресні посилання: MIM: 604415; NP_036581.1; NM_012449_1;

(4) 0772P (CA125, MUC16, код доступу GenBank AF361486); J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004/045553 (п. 14); WO2002/92836 (п. 6; Фіг. 12); WO2002/83866 (п. 15; стор. 116-121); US2003/124140 (Приклад 16); Перехресні посилання: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486_1;

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакаріоцит-потенціюючий фактор, мезотелін, код доступу GenBank NM_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); WO2003/101283 (п. 14); (WO2002/102235 (п. 13; стор. 287-288); WO2002/101075 (п. 4; стор. 308-309); WO2002/71928 (стор. 320-321); WO94/10312 (стор. 52-57); Перехресні посилання: MIM: 601051; NP_005814.2; NM_005823_1;

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, сімейство носіїв розчинних агентів 34 (фосфат натрію), член 2, натрій-залежний фосфатний транспортер 3b II типу, код доступу GenBank NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, JA, et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; WO2004/022778 (п. 2); EP1394274 (Приклад 11); WO2002/102235 (п. 13; стор. 326); EP0875569 (п. 1; стор. 17-19); WO2001/57188 (п. 20; стор. 329); WO2004/032842 (Приклад IV); WO2001/75177 (п. 24; стор. 139-140); Перехресні посилання: MIM: 604217; NP_006415.1; NM_006424_1;

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, семадомен, сім повторів тромбоспондин (1 типу та подібного 1 типу), трансмембранний домен (TM) та короткий цитоплазматичний домен, (семафорин) 5B, код доступу GenBank AB040878); Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; WO2004/000997 (п. 1); WO2003/003984 (п. 1); WO2002/06339 (п. 1; стор. 50); WO2001/88133 (п. 1; стор. 41-43, 48-58); WO2003/054152 (п. 20); WO2003/101400 (п. 11); код доступу: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN кДНК 2700050C12, RIKEN кДНК 2700050C12 ген, код доступу GenBank AY358628); Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US2003/129192 (п. 2); US2004/044180 (п. 12); US2004/044179 (п. 11); US2003/096961 (п. 11); US2003/232056 (Приклад 5); WO2003/105758 (п. 12); US2003/206918 (Приклад 5); EP1347046 (п. 1); WO2003/025148 (п. 20); Перехресні посилання: GI: 37182378; AAQ88991.1; AY358628_1;

(9) ETBR (рецептор ендотеліну типу B, код доступу GenBank AY275463); Nakamuta M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg RL, et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger EG, et al Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; WO2004/045516 (п. 1); WO2004/048938 (Приклад 2); WO2004/040000 (п. 151); WO2003/087768 (п. 1); WO2003/016475 (п. 1); WO2003/016475 (п. 1); WO2002/61087 (фіг. 1); WO2003/016494 (фіг. 6); WO2003/025138 (п. 12; стор. 144); WO2001/98351 (п. 1; стор. 124-125); EP0522868 (п. 8; Фіг. 2); WO2001/77172 (п. 1; стор. 297-299); US2003/109676; US6518404 (фіг. 3); US5773223 (п. 1a; кол. 31-34); WO2004/001004;

(10) MSG783 (RNF124, гіпотетичний білок FLJ20315, код доступу GenBank NM_017763); WO2003/104275 (п. 1); WO2004/046342 (Приклад 2); WO2003/042661 (п. 12); WO2003/083074 (п. 14; стор. 61); WO2003/018621 (п. 1); WO2003/024392 (п. 2; Фіг. 93); WO2001/66689 (Приклад 6); Перехресні посилання: LocusID: 54894; NP_060233.2; NM_017763_1;

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, асоційований із раком передміхурової залози ген 1, асоційований із раком передміхурової залози білок 1, антиген епітельних клітин передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами 2, білок передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами, код доступу GenBank AF455138); Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO2003/087306; US2003/064397 (п. 1; Фіг. 1); WO2002/72596 (п. 13; стор. 54-55); WO2001/72962 (п. 1; Фіг. 4B); WO2003/104270 (п. 11); WO2003/104270 (п. 16); US2004/005598 (п. 22); WO2003/042661 (п. 12); US2003/060612 (п. 12; Фіг. 10); WO2002/26822 (п. 23; Фіг. 2); WO2002/16429 (п. 12; Фіг. 10); Перехресні посилання: GI: 22655488; AAN04080.1; AF455138_1;

- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катіонний канал транзитного рецепторного потенціалу, підродина M, член 4, код доступу GenBank NM_017636); Xu, XZ, et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); US2003/143557 (п. 4); WO2000/40614 (п. 14; стор. 100-103); WO2002/10382 (п. 1; Фіг. 9A); WO2003/042661 (п. 12); WO2002/30268 (п. 27; стор. 391); US2003/219806 (п. 4); WO2001/62794 (п. 14; Фіг. 1A-D); Перехресні посилання: MIM: 606936; NP_060106.2; NM_017636_1;
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор росту тератокарциномного походження, код доступу GenBank NP_003203 або NM_003212); Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US2003/224411 (п. 1); WO2003/083041 (Приклад 1); WO2003/034984 (п. 12); WO2002/88170 (п. 2; стр. 52-53); WO2003/024392 (п. 2; Фіг. 58); WO2002/16413 (п. 1; стор. 94-95, 105); WO2002/22808 (п. 2; Фіг. 1); US5854399 (Приклад 2; Col 17-18); US5792616 (фіг. 2); Перехресні посилання: MIM: 187395; NP_003203.1; NM_003212_1;
- (14) CD21 (CR2 (рецептор комплементу 2) або C3DR (C3d/рецептор до вірусу Епштейна-Барра) або Hs, 73792 код доступу GenBank M26004); Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004/045520 (Приклад 4); US2004/005538 (Приклад 1); WO2003/062401 (п. 9); WO2004/045520 (Приклад 4); WO91/02536 (фіг. 9,1-9, 9); WO2004/020595 (п. 1); Код доступу: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786, 1;
- (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (імуноглобулін-асоційований бета), B29, код доступу GenBank NM_000626 або 11038674); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625; WO2004/016225 (п. 2, Фіг. 140); WO2003/087768, US2004/101874 (п. 1, стор. 102); WO2003/062401 (п. 9); WO2002 / 78524 (Приклад 2); US2002/150573 (п. 5, стор. 15); US5644033; WO2003/048202 (п. 1, стор. 306 і 309); WO 99/58658, US6534482 (п. 13, Фіг. 17A/B); WO2000/55351 (п. 11, стор. 1145-1146); Перехресні посилання: MIM: 147245; NP_000617.1; NM_000626_1;
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (містить SH2-домен фосфатазний якірний білок 1a), SPAP1B, SPAP1C, код доступу GenBank NM_030764, AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, MJ, et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004/016225 (п. 2); WO2003/077836; WO2001/38490 (п. 5; Фіг. 18D-1-18D-2); WO2003/097803 (п. 12); WO2003/089624 (п. 25); Перехресні посилання: MIM: 606509; NP_110391.2; NM_030764_1;
- (17) HER2 (ErbB2, код доступу GenBank M11730); Coussens L., et al Science (1985) 230 (4730):1132-1139; Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426-429; WO2004/048938 (Приклад 2); WO2004/027049 (фіг. 11); WO2004/009622; WO2003/081210; WO2003/089904 (п. 9); WO2003/016475 (п. 1); US2003/118592; WO2003/008537 (п. 1); WO2003 / 055439 (п. 29; Фіг. 1A-B); WO2003/025228 (п. 37; Фіг. 5C); WO2002/22636 (Приклад 13; стор. 95-107); WO2002/12341 (п. 68; Фіг. 7); WO2002/13847 (стор. 71-74); WO2002/14503 (стор. 114-117); WO2001/53463 (п. 2; стор. 41-46); WO2001/41787 (стор. 15); WO2000 / 44899 (п. 52; Фіг. 7); WO2000/20579 (п. 3; Фіг. 2); US5869445 (п. 3; Col 31-38); WO9630514 (п. 2; стор. 56-61); EP1439393 (п. 7); WO2004/043361 (п. 7); WO2004/022709; WO2001/00244 (Приклад 3; Фіг. 4); код доступу: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1;
- (18) NCA (CEACAM6, код доступу GenBank M18728); Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; WO2004/063709; EP1439393 (п. 7); WO2004/044178 (Приклад 4); WO2004/031238; WO2003/042661 (п. 12); WO2002/78524 (Приклад 2); WO2002 / 86443 (п. 27; стор. 427); WO2002/60317 (п. 2); код доступу: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;
- (19) MDP (DPER1, код доступу GenBank BC017023); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002)); WO2003/016475 (п. 1); WO2002/64798 (п. 33; стор. 85-87); JP05003790 (фіг. 6-8); WO99/46284 (фіг. 9); Перехресні посилання: MIM: 179780; AAN17023, 1; BC017023_1;
- (20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, код доступу GenBank AF184971); Clark HF, et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall AJ, et al Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9-19,

- 2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (Приклад 11); US2004/005320 (Приклад 5); WO2003/029262 (стор. 74-75); WO2003/002717 (п. 2; стор. 63); WO2002/22153 (стор. 45-47);
- 5 US2002/042366 (стор. 20-21); WO2001/46261 (стор. 57-59); WO2001/46232 (стор. 63-65); WO98/37193 (п. 1; стр. 55-59); Код доступу: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320, 1;
- (21) Бревікан (BCAN, BEHAV, код доступу GenBank AF229053); Gary SC, et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark HF, et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003/186372 (п. 11); US2003/186373 (п. 11); US2003/119131 (п. 1; Фіг. 52); US2003/119122 (п. 1; Фіг. +52); US2003/119126 (п. 1); US2003/119121 (п. 1; Фіг. 52); US2003/119129 (п. 1); US2003/119130 (п. 1); US2003/119128 (п. 1; Фіг. 52); US2003/119125 (п. 1); WO2003/016475 (п. 1); WO2002/02634 (п. 1);
- 10 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, код доступу GenBank NM_004442); Chan, J. та Watt, VM, Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000); WO2003042661 (п. 12); WO200053216 (п. 1; стор. 41); WO2004065576 (п. 1); WO2004020583 (п. 9); WO2003004529 (стор. 128-132); WO200053216 (п. 1; стор. 42); Перехресні посилання: MIM: 600997; NP_004433.2; NM_004442_1;
- (23) ASLG659 (B7h, код доступу GenBank AX092328); US2004/0101899 (п. 2); WO2003104399 (п. 11); WO2004000221 (Фіг. 3); US2003/165504 (п. 1); US2003/124140 (Приклад 2); US2003/065143 (Фіг. 60); WO2002/102235 (п. 13; стор. 299); US2003/091580 (Приклад 2); WO2002/10187 (п. 6; Фіг. 10); WO2001/94641 (п. 12; Фіг. 7b); WO2002/02624 (п. 13; Фіг. 1A-1B); US2002/034749 (п. 54; стор. 45-46); WO2002/06317 (Приклад 2; стор. 320-321, Claim 34; стор. 321-322); WO2002/71928 (стор. 468-469); WO2002/02587 (Приклад 1; Фіг. 1); WO2001/40269 (Приклад 3; стор. 190-192); WO2000 / 36107 (Приклад 2; стор. 205-207); WO2004/053079 (п. 12); WO2003/004989 (п. 1); WO2002/71928 (стор. 233-234, 452-453); WO 01/16318;
- 20 (24) PSCA (попередник антигену стовбурових клітин передміхурової залози, код доступу GenBank AJ297436); Reiter RE, et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004/022709; EP1394274 (Приклад 11); US2004/018553 (п. 17); WO2003/008537 (п. 1); WO2002/81646 (п. 1; стор. 164); WO2003/003906 (п. 10; стор. 288); WO2001/40309 (Приклад 1; Фіг. 17); US2001/055751 (Приклад 1; Фіг. 1b); WO2000/32752 (п. 18; Фіг. 1); WO98/51805 (п. 17; стор. 97); WO98/51824 (п. 10; стор. 94); WO98/40403 (п. 2; Фіг. 1B); Код доступу: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1;
- 25 (25) GEDA (код доступу GenBank AY260763); AAP14954 білок подібний партнеру за злиттям ліпомі HMGIC/pid=AAP14954,1 – Homo sapiens (людина); WO2003/054152 (п. 20); WO2003/000842 (п. 1); WO2003/023013 (Приклад 3, п. 20); US2003/194704 (п. 45); Перехресні посилання: GI: 30102449; AAP14954.1; AY260763_1;
- (26) BAFF-R (рецептор фактора активації В-клітин, BLyS рецептор 3, BR3, код доступу GenBank AF116456); BAFF рецептор /pid=NP_443177,1 – Homo sapiens: Thompson, JS, et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (Приклад; стор. 32-33); WO2003/014294 (п. 35; Фіг. 6B); WO2003/035846 (п. 70; стор. 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 (п. 3; стор. 133); WO2002/24909 (Приклад 3; Фіг. 3); Перехресні посилання: MIM: 606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600;
- 40 (27) CD22 (В-клітинний рецептор, ізоформа CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, код доступу GenBank AK026467); Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003/072036 (п. 1; Фіг. 1); Перехресні посилання: MIM: 107266; NP_001762.1; NM_001771_1;
- 45 (28) CD79a (CD79A, CD79a, імуноглобулін-асоційований альфа, специфічний В-клітинний білок, який ковалентно взаємодіє з Ig-бета (CD79B) й утворює комплекс на поверхні з молекулами Ig M, передає сигнал, залучений до диференціювання В-клітин), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Розташування гена в хромосомі: 19q13, 2, код доступу GenBank NP_001774, 10); WO2003/088808, US2003/0228319; WO2003/062401 (п. 9); US2002/150573 (п. 4, стор. 13-14); WO99/58658 (п. 13, Фіг. 16); WO92/07574 (Фіг. 1); US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Müller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;
- 50 (29) CXCR5 (Рецептор лімфоми Беркитта 1, зв'язаний із G-білком рецептора, який активується хемокіном CXCL13, функціонує при міграції лімфоцитів і в гуморальних реакціях імунітету, грає роль в інфекції HIV-2 й, можливо, розвитку СНІДу, лімфоми, мієломи та лейкозу); 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] Розташування гена в хромосомі: 11q23,3, код доступу
- 55 60

GenBank NP_001707,1); WO2004/040000; WO2004/015426; US2003/105292 (Приклад 2); US6555339 (Приклад 2); WO2002/61087 (фіг. 1); WO2001/57188 (п. 20, стор. 269); WO2001/72830 (стор. 12-13); WO2000/22129 (Приклад 1, стор. 152-153, Приклад 2, стор. 254-256); WO99/28468 (п. 1, стор. 38); US5440021 (Приклад 2, кол. 49-52); WO94/28931 (стор. 56-58); WO92/17497 (п. 7, Фіг. 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779;

(30) HLA-DOB (бета-субодиниця молекули MHC II класу (Ia антиген), яка пов'язує пептиди й представляє їх CD4+Т-лімфоцитам); 273 аа, pI: 6,56, MW: 30820.TM: 1 [P] розташування гена в хромосомі: 6p21,3, код доступу GenBank NP_002111,1); Tonnellet et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO99/58658 (п. 13, Фіг. 15); US6153408 (кол. 35-38); US5976551 (кол. 168-170); US6011146 (кол. 145-146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

(31) P2 × 5 (пуринергічний рецепторний P2X ліганд-залежний іонний канал 5; іонний канал, залежний від позаклітинного АТФ, може бути залучений до синаптичної передачі й нейрогенезу, недостатність може вносити вклад у патофізіологію ідіпатичної нестабільності детрузору); 422 аа, pI: 7, 63, MW: 47206 TM: 1 [P] Розташування гена в хромосомі: 17p13, 3, код доступу GenBank NP_002552, 2); Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004/047749; WO2003/072035 (п. 10); Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; WO2002/22660 (п. 20); WO2003/093444 (п. 1); WO2003/087768 (п. 1); WO2003/029277 (стор. 82);

(32) CD72 (антиген В-клітинного диференціювання CD72, Lyb-2); 359 аа, pI: 8,66, MW: 40225, TM: 1 [P] Розташування гена в хромосомі: 9p13,3, код доступу GenBank NP_001773,1); WO2004042346 (п. 65); WO2003/026493 (стор. 51-52, 57-58); WO2000/75655 (стор. 105-106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144 (12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;

(33) LY64 (антиген лімфоцитів 64 (RP105), мембранний білок I типу сімейства лейцин-багатих повторів (LRR), регулює активацію В-клітин і апоптоз, втрата функції пов'язана з підвищеною активністю захворювання у пацієнтів, які страждають системним червоним вовчаком); 661 аа, pI: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Розташування гена в хромосомі: 5q12, код доступу GenBank NP_005573,1); US2002/193567; WO97/07198 (п. 11, стор. 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38 (3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003/083047; WO97/44452 (п. 8, стор. 57-61); WO2000 / 12130 (стор. 24-26);

(34) FcRH1 (білок, подібний до Fc-рецептора 1, передбачуваний рецептор для Fc-домена імуноглобуліну, який містить Ig-подібний домен C2 типу й ITAM-домен, може приймати участь у диференціюванні В-лімфоцитів); 429 аа, pI: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Розташування гена в хромосомі: 1q21-1q22, код доступу GenBank NP_443170,1); WO2003/077836; WO2001/38490 (п. 6, Фіг. 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98 (17):9772-9777; WO2003/089624 (п. 8); EP1347046 (п. 1); WO2003/089624 (п. 7);

(35) IRTA2 (рецептор імуноглобулінового надсімейства, асоційований з транслокацією 2, передбачуваний імунорецептор, який приймає можливу участь у розвитку В-клітин і лімфомагенезі; при деяких злоякісних В-клітинних захворюваннях спостерігається дерегуляція гена транслокацією); 977 аа, pI: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P] Розташування гена в хромосомі: 1q21, код доступу GenBank людина: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571,1; WO2003/024392 (п. 2, Фіг. 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003/077836; WO2001/38490 (п. 3, Фіг. 18B-1-18B-2);

(36) TENB2 (TMEFF2, томорегулін, TPEF, HPP1, TR, передбачуваний трансмембранний протеоглікан, який відноситься до сімейства факторів росту EGF/херегулін і фолістатин); 374 аа, код доступу NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; номер гена NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; код доступу GenBank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004/074320; JP2004113151; WO2003/042661; WO2003/009814; EP1295944 (стор. 69-70); WO2002/30268 (стор. 329); WO2001/90304; US2004/249130; US2004/022727; WO2004/063355; US2004/197325; US2003/232350; US2004/005563; US2003/124579; Horie et al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynn-Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94 (2):178-84.

Початкове антитіло також може являти собою гібридний білок, який містить послідовність альбумін-зв'язуючого пептиду (ABP) (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy

For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Антитіла згідно з даним винаходом включають гібридні білки з послідовністю ABP, описані в джерелах: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043, Таблиці III і IV, стор. 35038; (ii) US 2004/0001827, [0076]; і (iii) WO 01/45746, стор. 12-13, усі з яких включені до даної заявки за допомогою посиланням.

Згідно з одним варіантом реалізації антитіло сконструйоване як специфічно спрямоване проти зв'язаного з пухлиною антигена $\alpha\beta_6$.

Агент, який зв'язується з клітинами, з'єднаний із лінкером. Згідно з одним варіантом реалізації агент, який зв'язується з клітинами, з'єднаний із групою А (за її наявності) лінкера.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і лінкером здійснюється через тіоефірний зв'язок.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і лінкером здійснюється через дисульфідний зв'язок.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і лінкером здійснюється через амідний зв'язок.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і лінкером здійснюється через складноефірний зв'язок.

Згідно з одним варіантом реалізації зв'язок між агентом, який зв'язується з клітинами, і лінкером утворюється між тіоловою групою цистеїнового залишку агента, який зв'язується з клітинами, й малеїмідною групою лінкера.

Залишки цистеїну агента, який зв'язується з клітинами, можуть бути доступними для реакції з функціональною групою R^L для утворення зв'язку. Згідно з іншими варіантами реалізації, наприклад, де агент, який зв'язується з клітинами, являє собою антитіло, тіолові групи антитіла можуть брати участь в утворенні міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Зазначені міжланцюгові зв'язки можуть бути перетворені у вільні тіолові групи, наприклад, шляхом обробки антитіла ДТТ до проведення реакції з функціональною групою R^L .

Агент, який зв'язується з клітинами, може бути міченим, наприклад, для забезпечення виявлення або очищення агента до його вбудовування в кон'югат чи в частину кон'югату. Мітка може являти собою біотинову мітку. Згідно з іншим варіантом реалізації агент, який зв'язується з клітинами, може бути міченим радіоактивним ізотопом.

R та R'

Згідно з одним варіантом реалізації R незалежно вибраний із необов'язково заміщеної C_{1-12} алкільної, C_{3-20} гетероциклічної та C_{5-20} арильної груп. Кожна із зазначених груп визначена в розділі замісників нижче.

Згідно з одним варіантом реалізації R незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{1-12} алкіл.

Згідно з одним варіантом реалізації R незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{3-20} гетероцикліл.

Згідно з одним варіантом реалізації R незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил.

Згідно з одним варіантом реалізації R незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{1-12} алкіл.

Вище описані різні варіанти реалізації винаходу стосовно R^2 , які відносяться до переважних алкільних і арильних груп та природи й числа необов'язкових замісників. Переважні варіанти, наведені для R^2 , оскільки вони застосовні до R , то також відносяться, якщо прийнятно, й до всіх інших груп R , наприклад, якщо R^6 , R^7 , R^8 або R^9 являє собою R .

Переважніні варіанти для R також відносяться до R'' .

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу запропоновано сполуку, яка містить групу-замісник $-NRR''$. Згідно з одним варіантом реалізації, R і R'' разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене 4-, 5-, 6- або 7-членне гетероциклічне кільце. Зазначене кільце може містити додатковий гетероатом, наприклад, N , O або S .

Згідно з одним варіантом реалізації гетероциклічне кільце містить як замісник групу R . Коли присутній додатковий гетероатом N , замісник може знаходитися у зазначеного гетероатома N .

R''

R'' являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O , S , $N(H)$, NMe і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця є необов'язково заміщеними.

Згідно з одним варіантом реалізації R'' являє собою C_{3-12} алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами і/або ароматичними

кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим.

Згідно з одним варіантом реалізації алкіленова група необов'язково переривається одним або більше гетероатомами, вибраними з O, S і NMe, і/або ароматичними кільцями, причому зазначені кільця є необов'язково заміщеними.

5 Згідно з одним варіантом реалізації ароматичне кільце являє собою C₅₋₂₀ ариленову групу, де арил відноситься до дивалентного фрагменту, отриманого шляхом видалення двох атомів водню від двох атомів ароматичного кільця ароматичної сполуки, причому зазначений фрагмент містить від 5 до 20 атомів в кільці.

10 Згідно з одним варіантом реалізації R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад, O, S, N(H), NMe, і/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH₂.

Згідно з одним варіантом реалізації R" являє собою C₃₋₁₂ алкіленову групу.

Згідно з одним варіантом реалізації R" вибраний із C₃, C₅, C₇, C₉ та C₁₁ алкіленової групи.

15 Згідно з одним варіантом реалізації R" вибраний із C₃, C₅ та C₇ алкіленової групи.

Згідно з одним варіантом реалізації R" вибраний із C₃ й C₅ алкіленової групи.

Згідно з одним варіантом реалізації R" являє собою C₃ алкіленову групу.

Згідно з одним варіантом реалізації R" являє собою C₅ алкіленову групу.

20 Алкіленові групи, перераховані вище, можуть необов'язково перериватися одним чи більше гетероатомами та/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця є необов'язково заміщеними.

Алкіленові групи, перераховані вище, можуть необов'язково перериватися одним чи більше гетероатомами та/або ароматичними кільцями, наприклад, бензольним або піридиновим.

25 Алкіленові групи, перераховані вище, можуть являти собою незаміщені лінійні аліфатичні алкіленові групи.

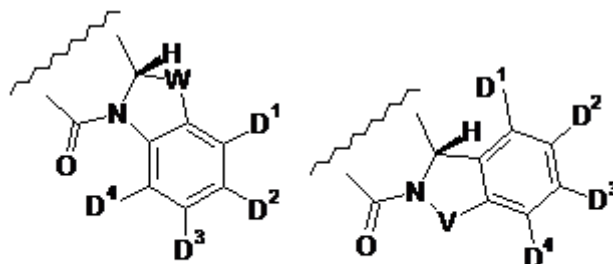
X

Згідно з одним варіантом реалізації X вибраний із O, S або N (H).

Переважно X являє собою O.

A-A, B-A, C-A, D-A та E-A

30 Сполуки формули AA, BA, CA, DA та EA містять групу R², яка разом із будь-яким з R¹ або R³, разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворює необов'язково заміщене бензольне кільце. Необов'язково заміщене бензольне кільце можна розглядати як конденсоване з C-кільцем піролбензодіазепіну. Конденсоване бензольне кільце може називатися D-кільцем. Структура конденсованого кільця показана нижче:



R¹ i R²

R³ i R²

35 де кожен із D¹, D², D³ та D⁴ являє собою H або замісник.

Згідно з одним варіантом реалізації бензольне кільце є незаміщеним.

40 Згідно з одним варіантом реалізації бензольне кільце необов'язково містить як замісник одну, дві, три або чотири групи, вибрані з OH, CN, R, OR, O-SO₂-R, CO₂R, COR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR", NO₂, Me₃Sn та галогену.

45 Згідно з одним варіантом реалізації бензольне кільце є монозаміщеним. Монозамісник може являти собою один із D¹, D², D³ або D⁴ (при цьому решта із зазначених являють собою H). Згідно з одним варіантом реалізації бензольне кільце містить як замісник D², і кожен із D¹, D³ та D⁴ являє собою H. Згідно з одним варіантом реалізації бензольне кільце містить як замісник D³, і кожен із D¹, D² й D⁴ являє собою H.

Згідно з одним варіантом реалізації R² й R¹ разом із атомами вуглецю C кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце.

Переважні варіанти для V й W наведені нижче.

A-B, B-B, C-B, D-B та E-B

50 Згідно з одним варіантом реалізації, U являє собою CH₂, коли T являє собою NR, BH, SO

або SO₂.

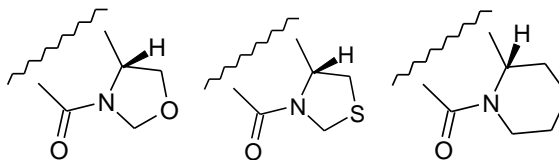
Згідно з одним варіантом реалізації, Т являє собою CH₂ або CO, коли U являє собою NR, O або S.

Згідно з одним варіантом реалізації, Т вибраний із CH₂ й CO.

5 Згідно з одним варіантом реалізації, U вибраний із NR, O й S.

Згідно з одним варіантом реалізації, Y являє собою (CH₂)_n, де n дорівнює 1 або 2.

Згідно з одним варіантом реалізації, C-кільце сполуки АВ має структуру, вибрану зі структур, показаних нижче:



10 V та W

Кожен із V і W вибраний із (CH₂)_n, O, S, NR, CHR і CRR'', де n дорівнює 2, 3 або 4, за винятком того, що V являє собою C, коли R¹ і R² разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце, й W являє собою C, коли R³ та R² разом із атомами вуглецю C-кільця, до яких вони приєднані, утворюють необов'язково заміщене бензольне кільце.

15 Згідно з одним варіантом реалізації, коли один із V і W являє собою C, інший із V і W вибраний із CH₂ та NR.

Згідно з одним варіантом реалізації, коли один із V і W являє собою C, інший із V і W являє собою CH₂.

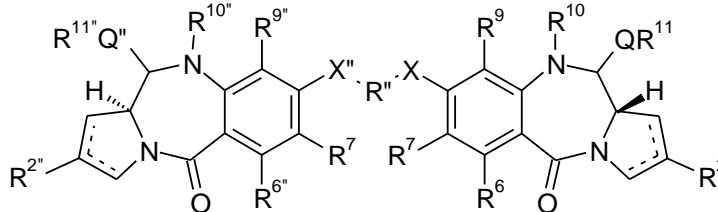
20 Димерні сполуки

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат згідно з першим аспектом винаходу, сполука C, сполука D та сполука E являють собою димери.

Кон'югати

25 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A).

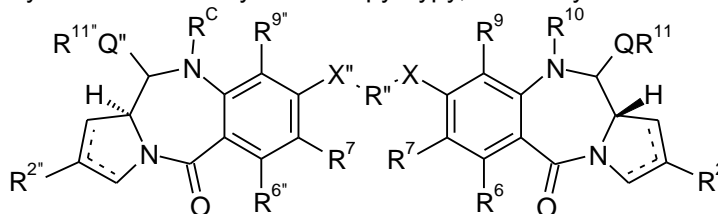
Згідно з одним варіантом реалізації димерна сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), причому зазначена сполука має структуру, показану нижче:



AA

30 де R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹⁰, X'', Q'' та R¹¹ є такими, як визначено для R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹⁰, X та R¹¹ відповідно.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), причому зазначена сполука має структуру, показану нижче:

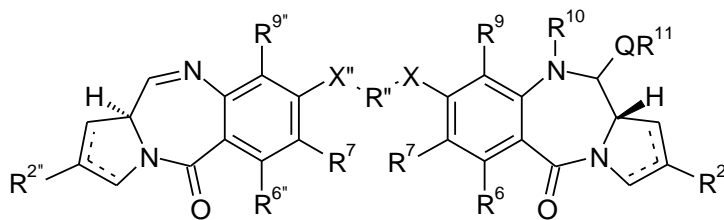


AB

35 де R², R⁶, R⁷, R⁹, X'', Q'' та R¹¹ є такими, як визначено для R², R⁶, R⁷, R⁹, X та R¹¹ відповідно, а R^C являє собою кепуючу групу. Згідно із зазначеним варіантом реалізації кожна група R¹⁰ являє собою лінкер, з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, один мономер якого має формулу (A), а інший мономер має формулу (B).

40 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, один мономер якого має формулу (A), а інший мономер має формулу (B), причому зазначена сполука має структуру, показану нижче:

**AC**

де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, X'' , Q'' та $R^{11''}$ є такими, як визначено для R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , X та R^{11} відповідно.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), а групи R^2 , R^6 , R^9 , X , R^{11} і R^7 , і R^8 , якщо застосовно, є однаковими.

Згідно з одним варіантом реалізації сполука являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), а групи R^2 , R^6 , R^9 , X , R^{11} , R^{10} і R^7 , і R^8 , якщо це застосовно, є однаковими. Така сполука може називатися симетричним димером.

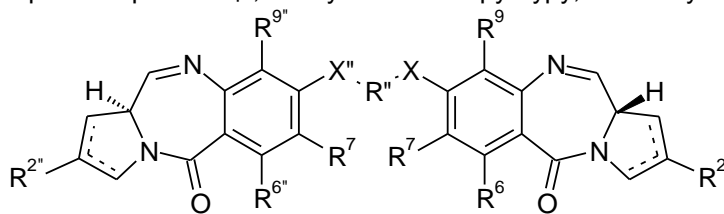
Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою димер, один мономер якого має формулу (A), а інший мономер має формулу (B), а групи R^2 , R^6 , R^9 і R^7 , і R^8 (A), якщо це застосовно, є такими ж, як зазначені групи сполуки (B).

Для кожної з димерних сполук, описаних вище, мономер формули (A) або (B) може бути замінений на мономер формули (A-I) або (B-I), описаної в даній заявці.

Сполука C

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука C являє собою димер.

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука C має структуру, показану нижче:

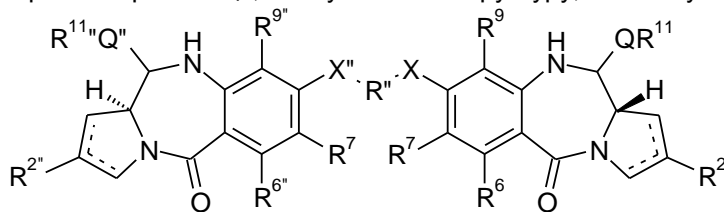
**CA**

де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$ та X'' є такими, як визначено для R^2 , R^6 , R^7 , R^9 та X відповідно.

Сполука D

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука D являє собою димер.

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука D має структуру, показану нижче:

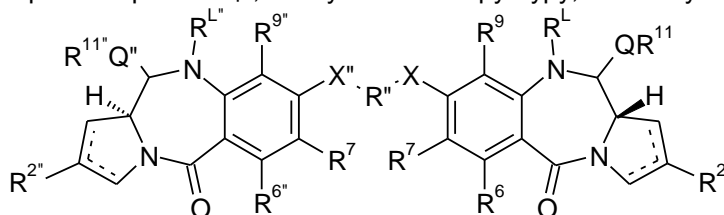
**DA**

де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, Q'' , $R^{11''}$ та X'' є такими, як визначено для R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , Q'' , $R^{11''}$ та X'' відповідно.

Сполука E

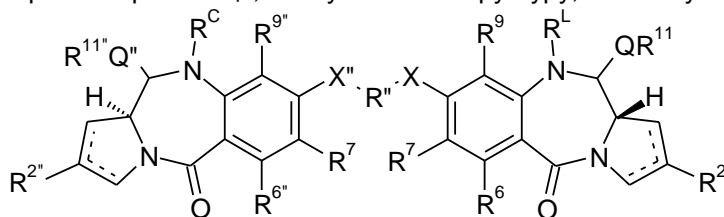
Згідно з одним варіантом реалізації, сполука E являє собою димер.

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука E має структуру, показану нижче:

**EA**

де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, $R^{11''}$, R^L , Q та X'' є такими, як визначено для $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, $R^{11''}$, R^L та X'' відповідно.

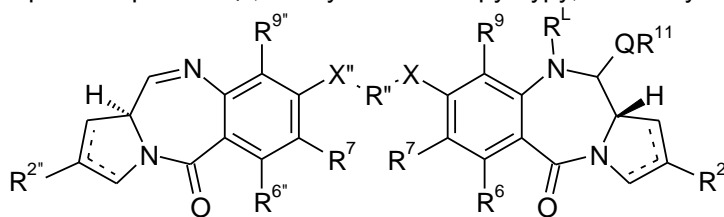
Згідно з одним варіантом реалізації, сполука E має структуру, показану нижче:



EB

- 5 де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, $R^{11''}$, Q та X'' є такими, як визначено для $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$, $R^{11''}$ та X'' відповідно. R^C являє собою кепуючу групу.

Згідно з одним варіантом реалізації, сполука E має структуру, показану нижче:



EC

де $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$ та X'' є такими, як визначено для $R^{2''}$, $R^{6''}$, $R^{7''}$, $R^{9''}$ та X'' відповідно.

- 10 Мономерні сполуки

Згідно з одним варіантом реалізації, кон'югат згідно з першим аспектом даного винаходу, сполука C, сполука D та сполука E являють собою мономерні.

Згідно з одним варіантом реалізації, кон'югат або сполука формули (C), (D) або (E) може бути замінена на мономер формули (AI), (CI), (DI) або (EI), як описано в даній заявці.

- 15 Кепуюча група R^C

Кон'югат згідно з першим аспектом даного винаходу може містити кепуючу групу R^C в положенні N10. Сполука E може містити кепуючу групу R^C .

Згідно з одним варіантом реалізації, коли кон'югат являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), група R^{10} в одній із мономерних ланок являє собою кепуючу групу R^C або являє собою групу R10.

- 20

Згідно з одним варіантом реалізації, коли кон'югат являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (A), група R^{10} в одній із мономерних ланок являє собою кепуючу групу R^C .

Згідно з одним варіантом реалізації, коли сполука E являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (E), група R^L в одній із мономерних ланок являє собою кепуючу групу R^C або являє собою лінкер для сполуки з агентом, який зв'язується з клітинами.

- 25

Згідно з одним варіантом реалізації, коли сполука E являє собою димер, кожен мономер якого має формулу (E), група R^L в одній із мономерних ланок являє собою кепуючу групу R^C .

Група R^C здатна видалятися з положення N10 фрагменту PBD з утворенням N10-C11 імінного зв'язку, карбіноламіну, заміщеного карбіноламіну, якщо QR^{11} являє собою OSO_3M , бісульфитного аддукту, тіокарбіноламіну, заміщеного тіокарбіноламіну або заміщеного карбіноламіну.

- 30

Згідно з одним варіантом реалізації R^C може являти собою захисну групу, яка здатна видалятися з утворенням N10-C11 імінного зв'язку, карбіноламіну, заміщеного карбіноламіну або, якщо QR^{11} являє собою OSO_3M , бісульфитного аддукту. Згідно з одним варіантом реалізації R^C являє собою захисну групу, яка здатна видалятися з утворенням N10-C11 імінного зв'язку.

- 35

Група R^C повинна бути здатною видалятися в таких же умовах, які потрібні для видалення групи R^{10} , наприклад, з утворенням N10-C11 імінного зв'язку, карбіноламіну і т.д. Кепуюча група діє як захисна група для передбачуваної функціональної групи в положенні N10. Кепуюча група не повинна бути реакційноздатною стосовно агента, який зв'язується з клітинами. Наприклад, R^C не є таким же, як R^L .

- 40

Сполуки, які містять кепуючу групу, можуть використовуватися як інтермедіати в синтезі димерів, що містять імінний мономер. Альтернативно, сполуки, які містять кепуючу групу, можуть використовуватися як кон'югати, якщо кепуюча група видаляється в області-мішені з отриманням іміну, карбіноламіну, заміщеного карбіноламіну і т.д. Таким чином, згідно із

зазначеним варіантом реалізації, кепуюча група може називатися захисною групою азоту, що терапевтично видаляється, як визначено в більш ранній публікації міжнародної заявки авторів даного винаходу WO 00/12507.

5 Згідно з одним варіантом реалізації, група R^C здатна видалятися в умовах, у яких розщеплюється лінкер R^L групи R^{10} . Таким чином, згідно з одним варіантом реалізації кепуюча група розщеплюється під дією ферменту.

Згідно з альтернативним варіантом реалізації, кепуюча група піддається видаленню до зв'язування лінкера R^L з агентом, який зв'язується з клітинами. Згідно із зазначеним варіантом реалізації, кепуюча група видаляється в умовах, в яких не розщеплюється лінкер R^L .

10 Якщо сполука містить функціональну групу G^1 для утворення зв'язку з агентом, який зв'язується з клітинами, то кепуюча група видаляється до додавання або видалення захисної групи від G^1 .

Кепуюча група може застосовуватися в методі використання захисних груп для забезпечення того, що тільки одна з мономерних ланок у димері з'єднується з агентом, який зв'язується з клітинами.

Кепуюча група може використовуватися як маскуюча група для N10-C11 імінного зв'язку. Кепуюча група може бути видалена в той момент, коли потрібна імінна функціональна група сполуки. Кепуюча група також є маскуючою групою для карбіноламіну, заміщеного карбіноламіну і бісульфітного аддукту, як описано вище.

20 R^C може являти собою захисну групу для N10, таку як групи, що описані в більш ранній публікації міжнародної заявки авторів даного винаходу WO 00/12507. Згідно з одним варіантом реалізації, R^C являє собою захисну групу азоту, що терапевтично видаляється, як визначено в більш ранній публікації міжнародної заявки авторів даного винаходу WO 00/12507.

Згідно з одним варіантом реалізації, R^C являє собою карбаматну захисну групу.

25 Згідно з одним варіантом реалізації, карбаматна захисна група вибрана з:

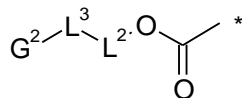
Allos, Fmoc, Boc, Troc, Teos, Psec, Cbz і PNZ.

Необов'язково карбаматна захисна група також обрана з Moc.

Згідно з одним варіантом реалізації, R^C являє собою лінкерну групу R^L , в якій відсутня функціональна група для зв'язування з агентом, який зв'язується з клітинами.

30 Дана заявка, зокрема, відноситься до таких груп R^C , які являють собою карбамати.

Згідно з одним варіантом реалізації, R^C являє собою наступну групу:



де зірочка позначає місце приєднання до положення N10, G^2 являє собою кінцеву групу, L^3 являє собою ковалентний зв'язок або здатний до розщеплення лінкер L^1 , L^2 являє собою ковалентний зв'язок або разом із $OC(=O)$ утворює лінкер, що саморозщеплюється.

35 Коли L^3 і L^2 являють собою ковалентні зв'язки, G^2 і $OC(=O)$ разом утворюють карбаматну захисну групу, як визначено вище.

L^1 є таким, як визначено вище для R^{10} .

L^2 є таким, як визначено вище для R^{10} .

40 Різні кінцеві групи описані нижче, включаючи групи на основі добре відомих захисних груп.

Згідно з одним варіантом реалізації, L^3 являє собою здатний до розщеплення лінкер L^1 , і L^2 разом із $OC(=O)$ утворює лінкер, що саморозщеплюється. Згідно із зазначеним варіантом реалізації, G^2 являє собою Ac (ацетил) або Moc, або карбаматну захисну групу, вибрану з:

Allos, Fmoc, Boc, Troc, Teos, Psec, Cbz і PNZ.

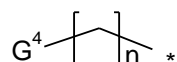
45 Необов'язково карбаматна захисна група також обрана з Moc.

Згідно з іншим варіантом реалізації G^2 являє собою ацильну групу $-C(=O)G^3$, де G^3 вибраний із алкілу (включаючи циклоалкіл, алкеніл та алкініл), гетероалкілу, гетероциклілу й арилу (включаючи гетероарил і карбоарил). Зазначені групи можуть бути необов'язково заміщеними. Ацильна група разом із аміногрупою L^3 або L^2 , якщо це застосовно, може утворювати амідний зв'язок. Ацильна група разом із гідроксигрупою L^3 або L^2 , якщо це застосовно, може утворювати складноефірний зв'язок.

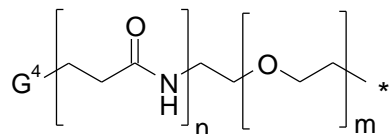
Згідно з одним варіантом реалізації G^3 являє собою гетероалкіл. Гетероалкільна група може включати поліетиленгліколь. Гетероалкільна група може містити гетероатом, такий як O або N, суміжний із ацильною групою, з утворенням, таким чином, карбаматної або карбонатної групи, якщо це застосовно, з гетероатомом, присутнім у групі L^3 або L^2 , якщо це застосовно.

Згідно з одним варіантом реалізації, G^3 вибраний із NH_2 , NHR та NRR ". Переважно G^3 являє собою NRR ".

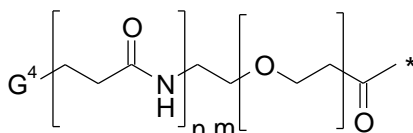
Згідно з одним варіантом реалізації, G^2 являє собою наступну групу:



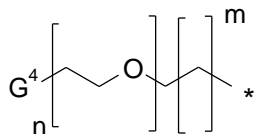
де зірочка позначає місце приєднання до L^3 , а n і G^4 є такими, як визначено вище.
Згідно з одним варіантом реалізації, група G^2 являє собою:



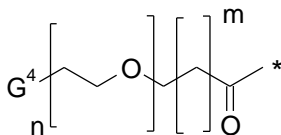
- 5 де зірочка позначає місце приєднання до L^3 , n дорівнює 0 або 1, m дорівнює 0-50, а G^4 вибраний із OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR", NH₂, NHR, NRR", NO₂ та галогену. Згідно з переважним варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 0-10, 1-2, переважно 4-8 і найбільш переважно 4 або 8. Згідно з іншим варіантом реалізації n дорівнює 1 і m дорівнює 10-50, переважно 20-40. Групи OH, SH, NH₂ і NHR є захищеними. Згідно з одним варіантом реалізації G^4 являє собою OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR" та NRR". Згідно з одним варіантом реалізації G^4 являє собою OR, SR та NRR". Переважно G^4 вибраний із OR або NRR", найбільш переважно G^4 являє собою OR. Переважно G^4 являє собою OMe.
- 10 Згідно з одним варіантом реалізації група G^2 являє собою:



- 15 де зірочка позначає місце приєднання до L^3 , а n , m та G^4 є такими, як визначено вище.
Згідно з одним варіантом реалізації група G^2 являє собою:



- 20 де n дорівнює 1-20, m дорівнює 0-6 і G^4 вибраний із OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR", NH₂, NHR, NRR", NO₂ та галогену. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 1-10. Згідно з іншим варіантом реалізації n дорівнює 10-50, переважно 20-40. Згідно з одним варіантом реалізації n дорівнює 1. Згідно з одним варіантом реалізації m дорівнює 1. Групи OH, SH, NH₂ та NHR є захищеними. Згідно з одним варіантом реалізації G^4 являє собою OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR" та NRR". Згідно з одним варіантом реалізації G^4 являє собою OR, SR та NRR". Переважно G^4 вибраний із OR та NRR", найбільш переважно G^4 являє собою OR. Переважно G^4 являє собою OMe.
- 25 Згідно з одним варіантом реалізації група G^2 являє собою



- 30 де зірочка позначає місце приєднання до L^3 , а n , m та G^4 є такими, як визначено вище.
Згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, G^4 може являти собою OH, SH, NH₂ та NHR. Зазначені групи переважно є захищеними.
Згідно з одним варіантом реалізації, OH містить захисну групу Bzl, TBDMS або TBDPS.
Згідно з одним варіантом реалізації, SH містить захисну групу AcM, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me або Trt.
- 35 Згідно з одним варіантом реалізації, NH₂ або NHR містить захисну групу Boc, Mos, Z-Cl, Fmoc, Z або Alloc.

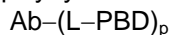
Згідно з одним варіантом реалізації група G^2 присутня в комбінації з групою L^3 , причому зазначена група являє собою дипептид.

- 40 Кепуюча група не повинна зв'язуватися з агентом, який зв'язується з клітинами. Таким чином, інший мономер, присутній у димері, служить як місце з'єднання з агентом, який зв'язується з клітинами через лінкер. Відповідно, переважно функціональна група, присутня в

кепуючій групі, не є доступною для реагування з агентом, який зв'язується з клітинами. Таким чином, реакційноздатні функціональні групи, такі як OH, SH, NH₂, COOH, переважно не використовуються. Однак така функціональна група може бути присутньою в кепуючій групі, якщо вона містить захисну групу, як описано вище.

5 При отриманні сполук згідно з даним винаходом кепуюча група може використовуватися для отримання лінкера R^L.

Приклад варіанта реалізації сполуки, яка являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), містить антитіло (Ab) та фрагмент PBD лікарського засобу (PBD), де антитіло приєднане за допомогою лінкерного фрагмента (L) до PBD; при цьому вказана композиція має таку формулу:



де p дорівнює цілому числу від 1 до приблизно 8 та позначає навантаження лікарського засобу. Якщо Ab являє собою сконструйоване на основі цистеїну антитіло, то число фрагментів лікарського засобу, які можуть кон'югувати через тіловий реакційноздатний лінкерний фрагмент з молекулою антитіла, обмежується кількістю цистеїнових залишків, які вводяться відповідно до способів, описаних у даній заявці. Приклади ADC, таким чином, включають антитіла, які містять 1, 2, 3 або 4 сконструйовані цистеїни.

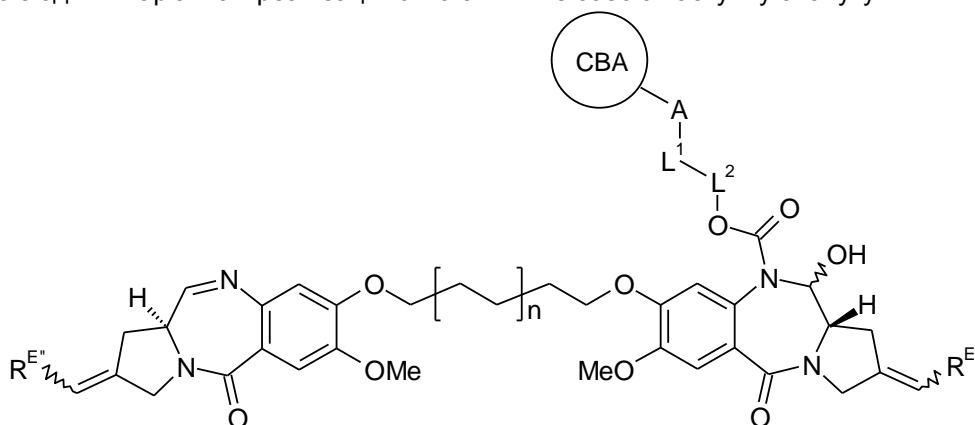
Переважні сполуки

Згідно з одним варіантом реалізації, кон'югат являє собою димер, де кожен із мономерів містить C2 метиленову групу, тобто кожен R² являє собою =CH₂. Переважно агент, який зв'язується з клітинами, являє собою антитіло.

Згідно з іншим варіантом реалізації, кон'югат являє собою димер, де кожен із мономерів містить C2 арильну групу, тобто кожен R² являє собою необов'язково заміщений C₅₋₂₀ арил. Переважно агент, який зв'язується з клітинами, являє собою антитіло.

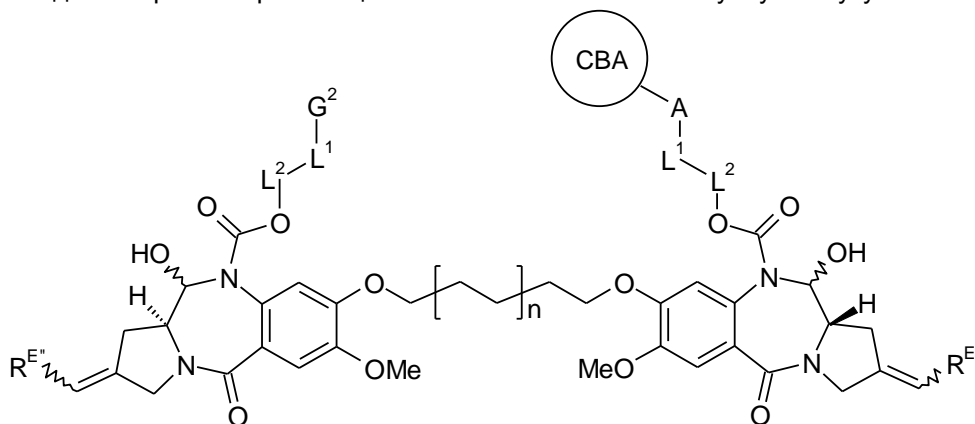
C2 Алкілен

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L¹ та L² є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E та R^{E'} незалежно вибраний із H або R^D.

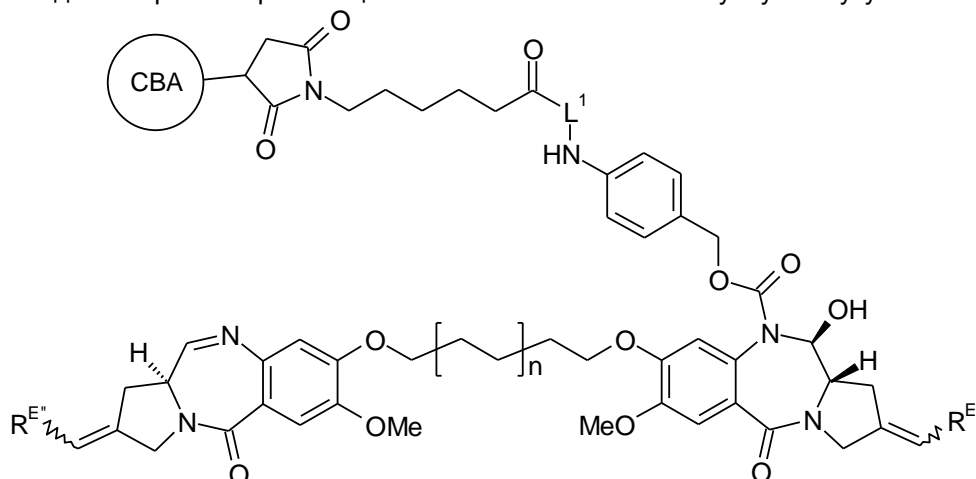
Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L¹, L² та G² є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E

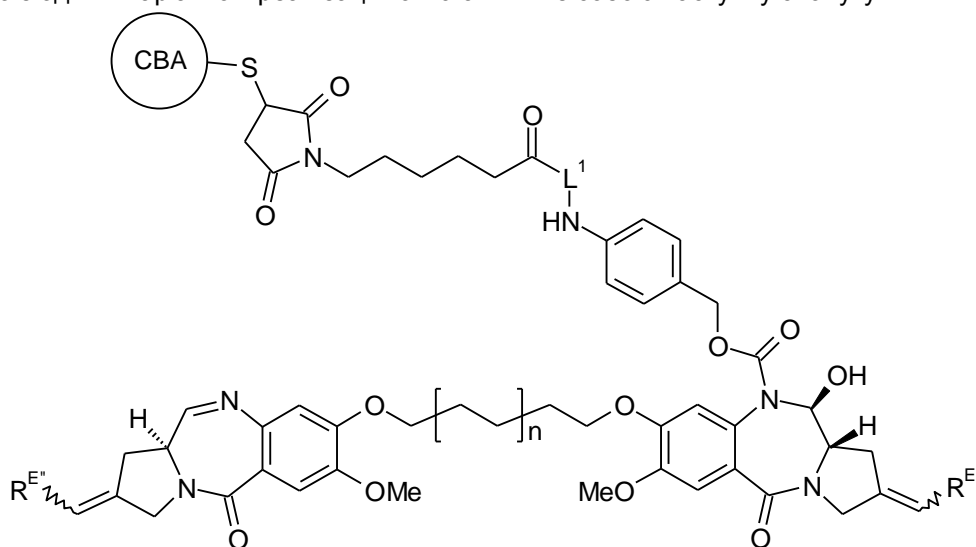
та R^E незалежно вибраний із H або R^D .

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



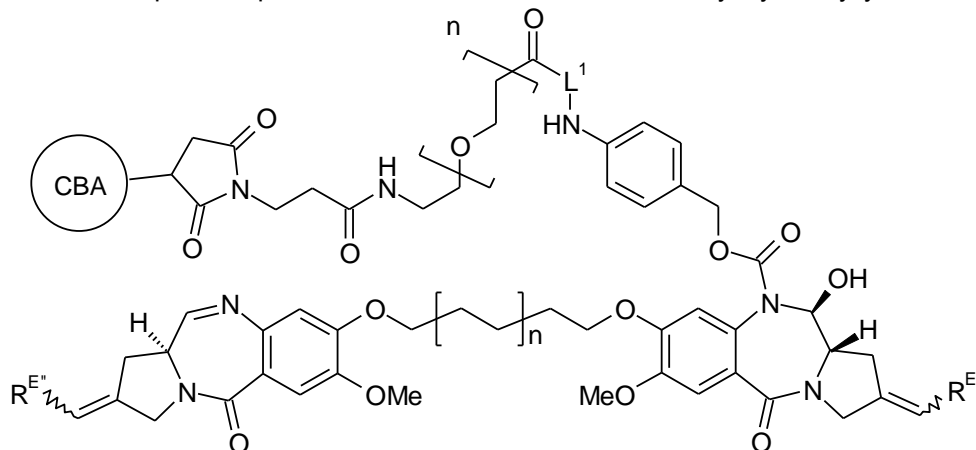
де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний або лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L^1 є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E та R^E незалежно вибраний із H або R^D .

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L^1 є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E та R^E незалежно вибраний із H або R^D .

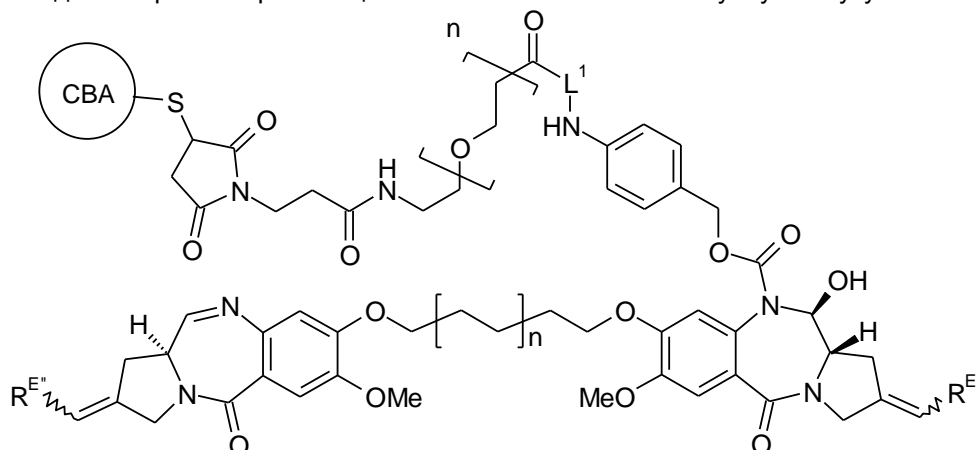
Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи

лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L^1 є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E та $R^{E''}$ незалежно вибраний із H або R^D .

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



5 де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, а n дорівнює 0 або 1. L^1 є такими, як визначено раніше, й кожен із R^E та R^{E^*} незалежно вибраний із H або R^D .

Для кожної зі сполук, описаних вище, можуть бути застосовні наступні переважні варіанти, якщо це є прийнятним:

10 n дорівнює 0;

n дорівнює 1;

R^E являє собою H :

R^E являє собою R^D , де R^D являє собою необов'язково заміщений алкіл;

R^E являє собою R^D , де R^D являє собою метил;

15 СВА являє собою антитіло:

СВА являє собою циклічний пептид:

L^1 являє собою або містить дипептид:

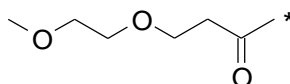
L¹ являє собою (H₂N)-Val-Ala-(CO) або (H₂N)-Phe-Lys-(CO), де (H₂N) та (CO) позначають відповідний N- та C-кінці;

20 L^2 являє собою *p*-амінобензилєн:

G^2 вибраний із Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz і PNZ.

Наступні переважні варіанти можуть також бути застосовними на додаток до переважних варіантів, описаних вище:

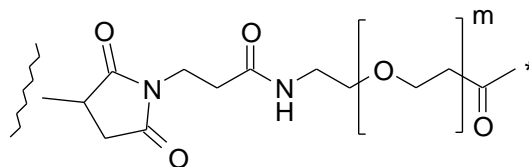
G^2 являє собою:



25

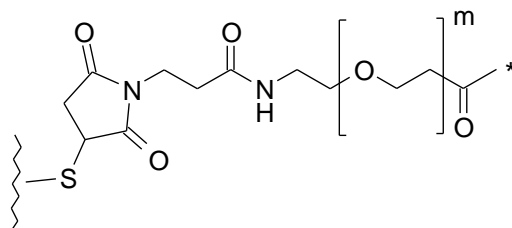
де зірочка позначає місце приєднання до N-кінця L¹:

А являє собою:



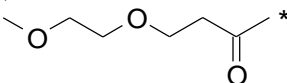
де зірочка позначає місце приєднання до N-кінця L^1 , хвиляста лінія позначає місце
30 приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, а m дорівнює 4 або 8;

А являє собою

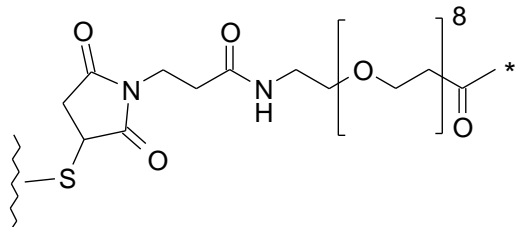


де зірочка позначає місце приєднання до N-кінця L^1 , хвиляста лінія позначає місце приєднання до агента, який зв'язується з клітинами, а m дорівнює 4 або 8.

Згідно з особливо переважним варіантом реалізації п дорівнює 1; R^E являє собою H; CBA являє собою антитіло; L^1 являє собою $(H_2N)\text{-Val-Ala-(CO)}$ або $(H_2N)\text{-Phe-Lys-(CO)}$, де (H_2N) та (CO) позначає відповідні N- та C-кінці; L^2 являє собою п-амінобензилєн; G^2 являє собою:



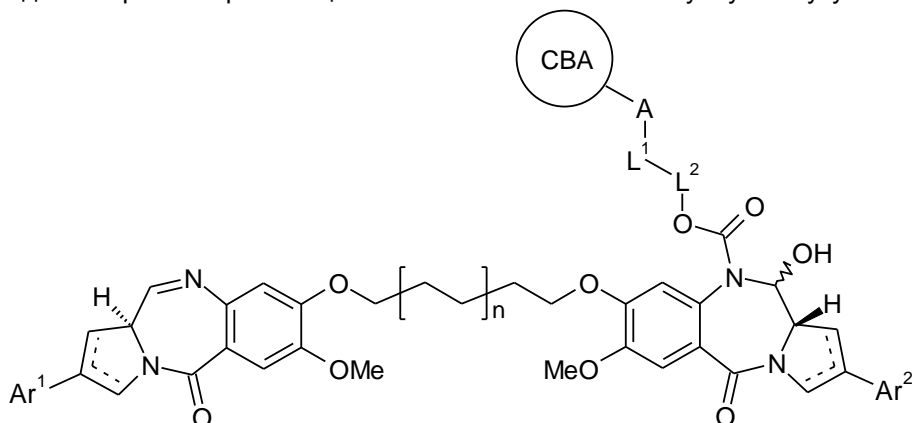
де зірочка позначає місце приєднання до N-кінця L^1 ; та A являє собою



де зірочка позначає місце приєднання до N-кінця L^1 , та хвиляста лінія позначає місце
10 приєднання до агента, який зв'язується з клітинами.

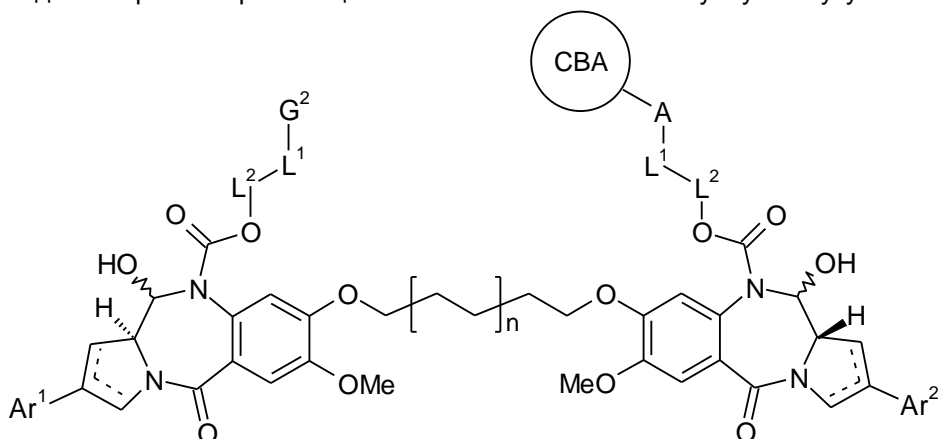
C2 Арил

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



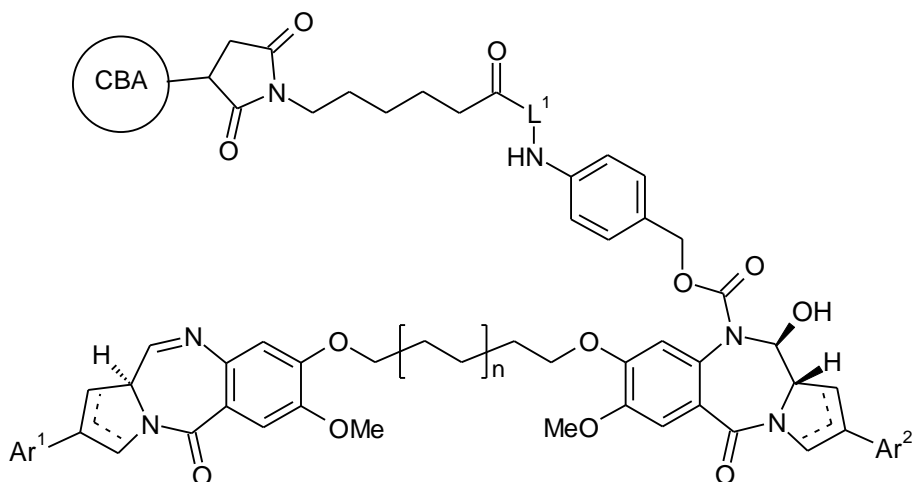
де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 та L^2 є такими, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 або 1. Ar^1 та Ar^2 можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



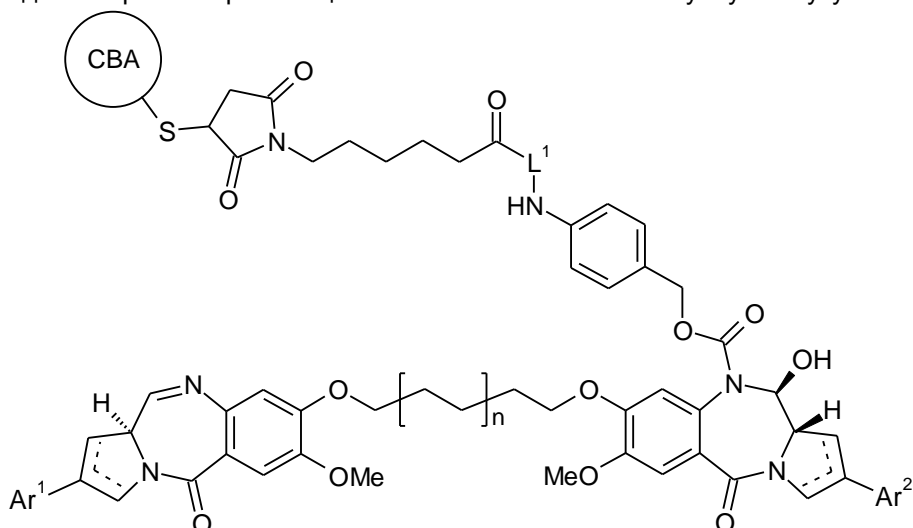
20 де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 , L^2 та G^2 є такими, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 чи 1.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



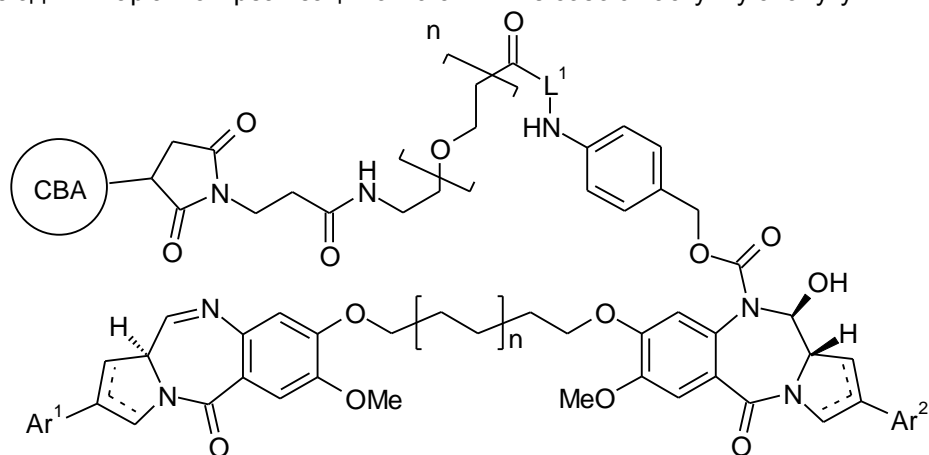
де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 чи 1.

5 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



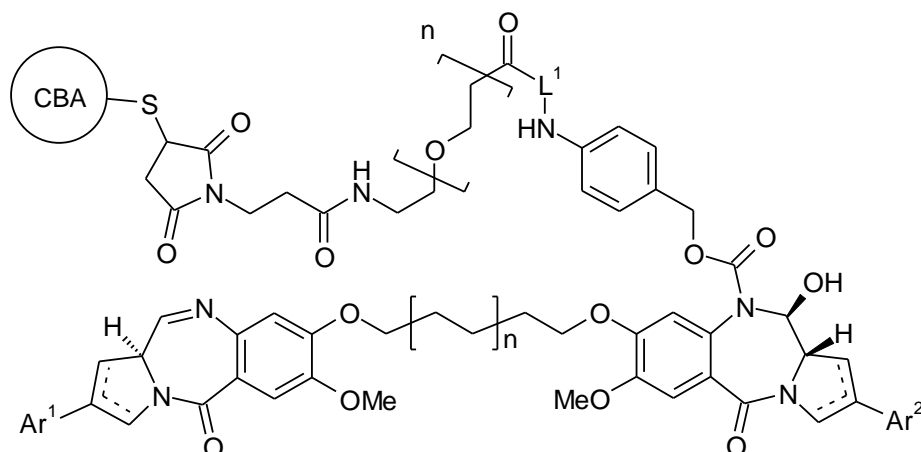
де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 чи 1.

10 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 чи 1.

15 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 чи 1.

5 Згідно з одним варіантом реалізації, кожний із Ar^1 та Ar^2 згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, незалежно вибраний із необов'язково заміщеного фенілу, фуранілу, тіофенілу та піридилу.

Згідно з одним варіантом реалізації, Ar^1 та Ar^2 згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, являють собою необов'язково заміщений феніл.

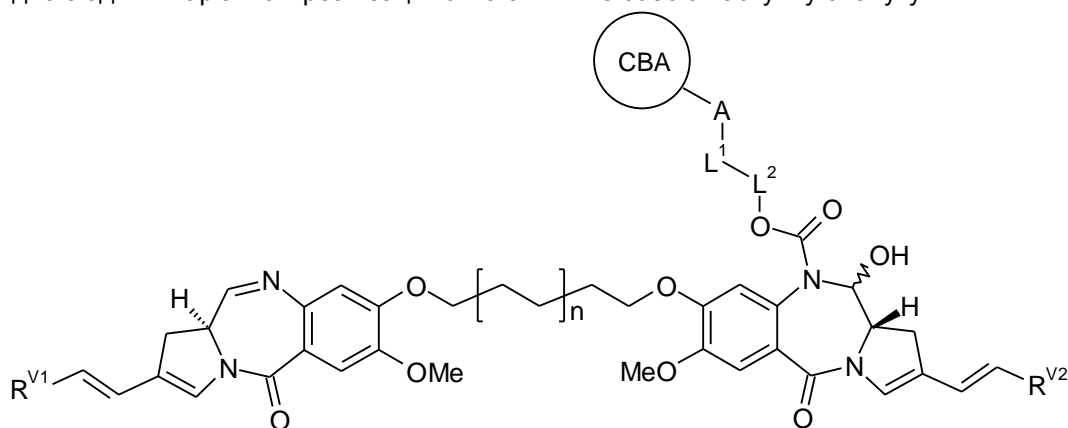
10 Згідно з одним варіантом реалізації, Ar^1 та Ar^2 згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, являють собою необов'язково заміщений тіофен-2-іл або тіофен-3-іл.

Згідно з одним варіантом реалізації, Ar^1 та Ar^2 згідно з кожним із варіантів реалізації, зазначених вище, являють собою необов'язково заміщений хінолініл або ізохінолініл.

15 Хінолінільна або ізохінолінільна група може бути зв'язана з PBD-ядром через будь-яке доступне положення в кільці. Наприклад, хінолініл може являти собою хінолін-2-іл, хінолін-3-іл, хінолін-4-іл, хінолін-5-іл, хінолін-6-іл, хінолін-7-іл та хінолін-8-іл. Із зазначених сполук хінолін-3-іл та хінолін-6-іл можуть бути переважними. Ізохінолініл може являти собою ізохінолін-1-іл, ізохінолін-3-іл, ізохінолін-4-іл, ізохінолін-5-іл, ізохінолін-6-іл, ізохінолін-7-іл та ізохінолін-8-іл. Із зазначених сполук ізохінолін-3-іл та ізохінолін-6-іл можуть бути переважними.

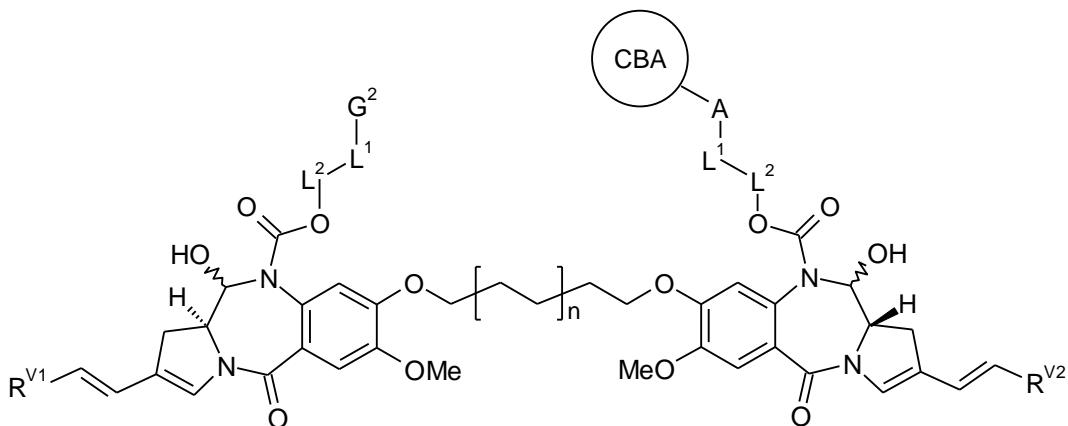
20 C2 Вініл

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



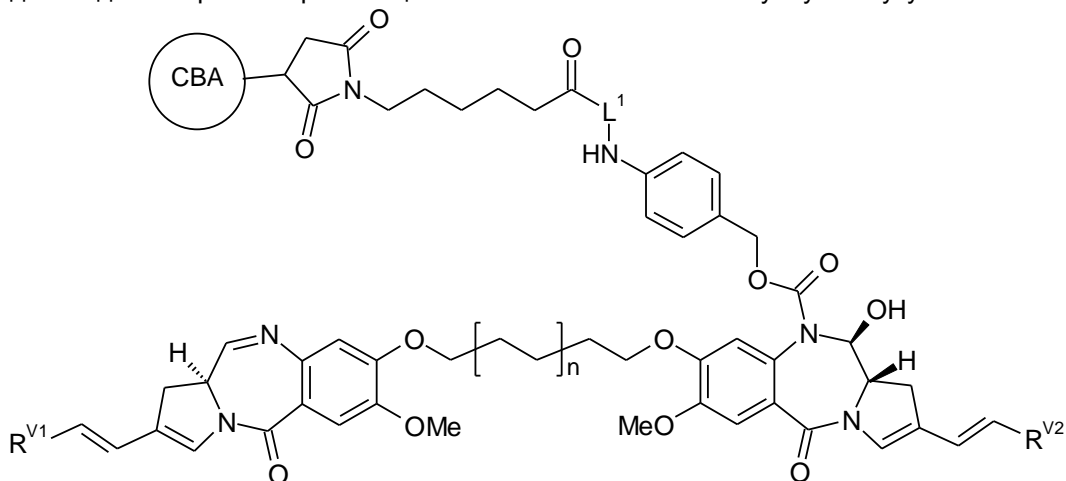
25 де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний або лінійний пептид, L^1 та L^2 є такими, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу і фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), і C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



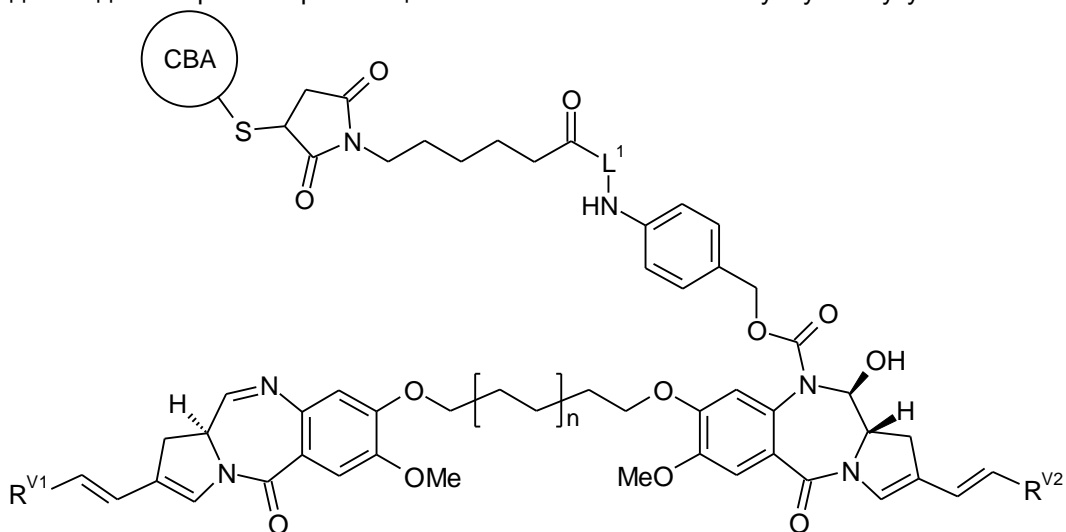
де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 та L^2 , та G^2 є такими, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з Н, метилу, етилу та фенолу (причому зазначений фенол може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



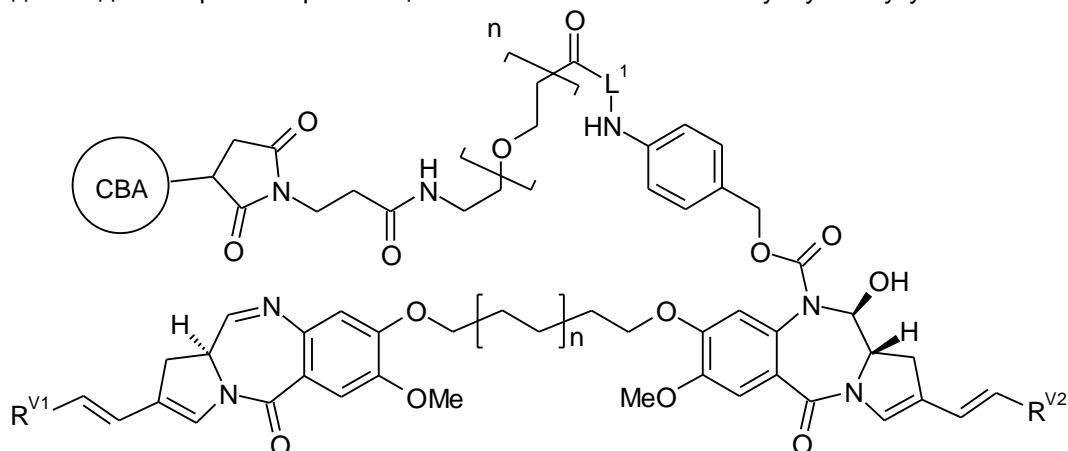
де СВА являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з Н, метилу, етилу та фенолу (причому зазначений фенол може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



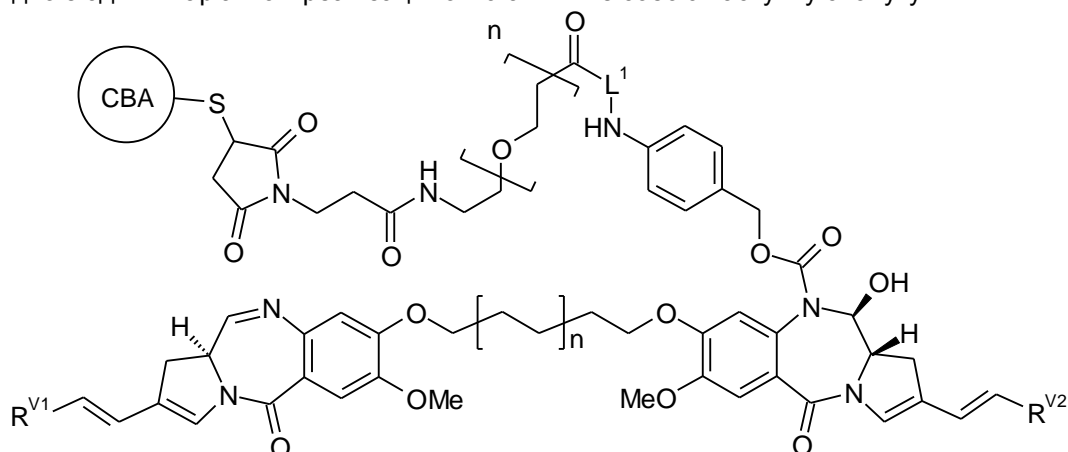
- де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу та фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



- де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу та фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою наступну сполуку:



- де CBA являє собою агент, який зв'язується з клітинами, такий як антитіло або циклічний чи лінійний пептид, L^1 є таким, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу та фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, й n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

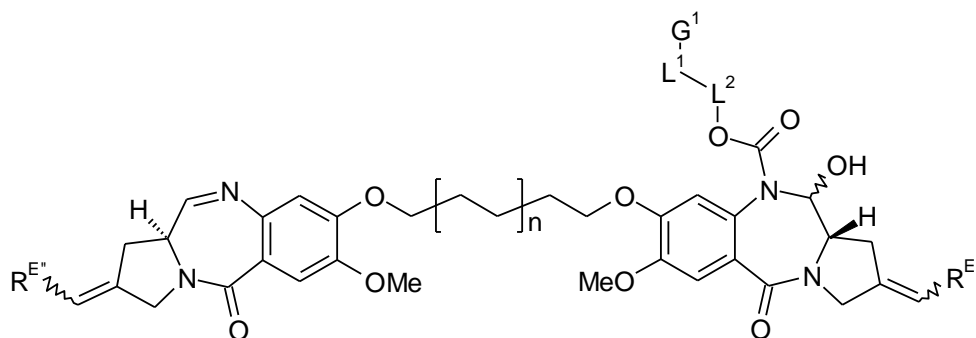
- Згідно з деякими з описаних вище варіантів реалізації R^{V1} та R^{V2} можуть бути незалежно вибрані з H, фенілу і 4-фторфенілу.

Переважні інтермедіати

Згідно з даним винаходом також запропоновані інтермедіати для застосування при одержанні сполук, що яляють собою кон'югати, описані в даній заявці.

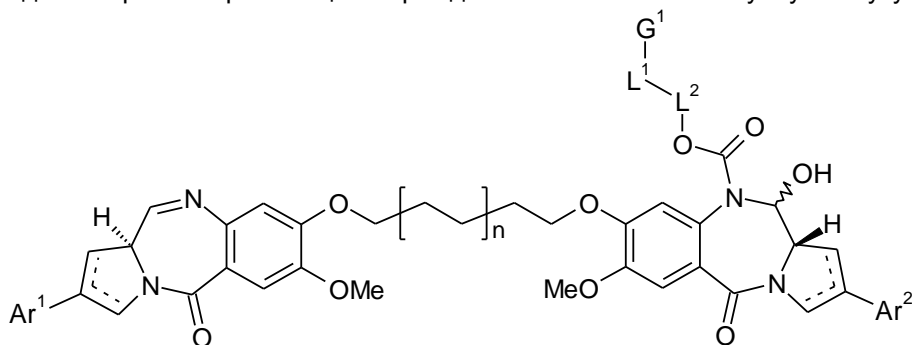
- Переважні інтермедіати описані нижче й добре відповідають переважним кон'югатам, описаним вище.

Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



де n дорівнює 0 або 1, G^1 , L^1 та L^2 є такими, як визначено вище, й кожен R^E та $R^{E'}$ незалежно вибраний із H або R^D .

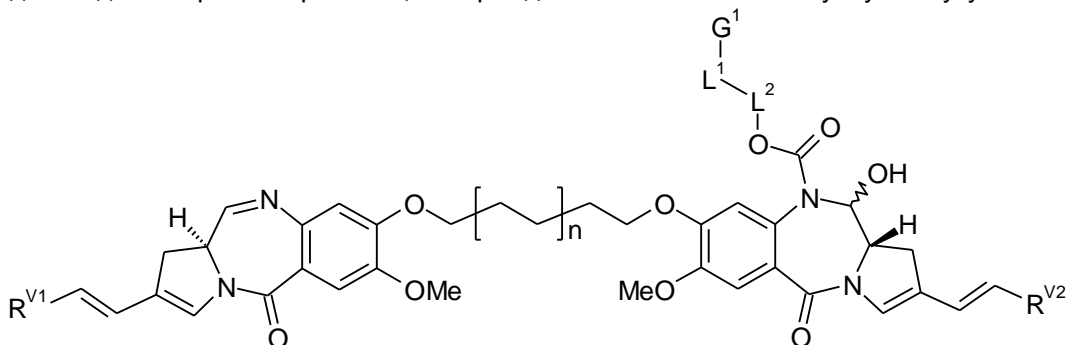
Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою з наступну сполуку:



5

де G^1 , L^1 та L^2 є такими, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 або 1. Ar^1 та Ar^2 можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою з наступну сполуку:

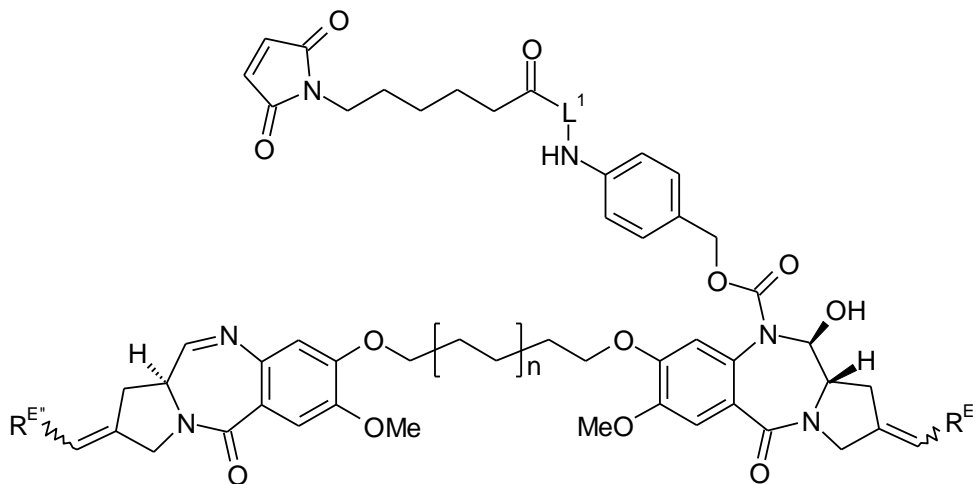


10

де G^1 , L^1 та L^2 є такими, як визначено раніше, R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу й фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, і n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

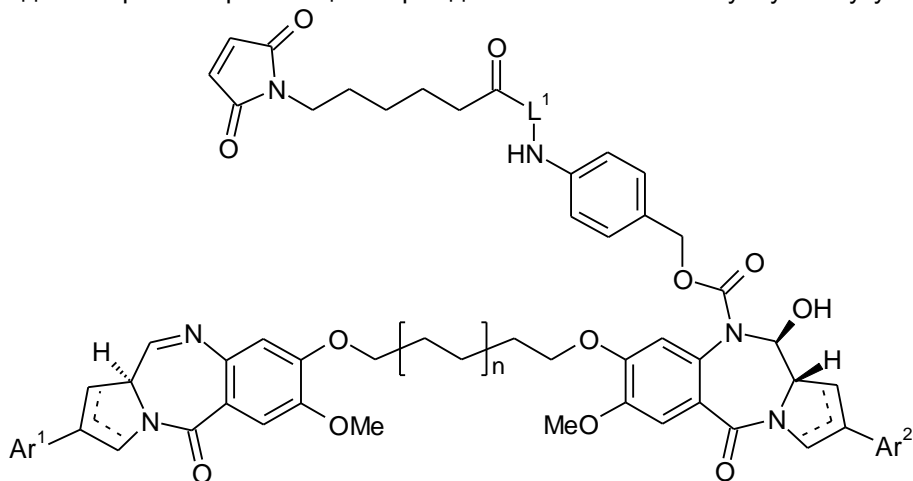
15

Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



де n дорівнює 0 або 1, L^1 є таким, як визначено раніше, і кожен із R^E та R^{E^*} незалежно вибраний із H або R^D .

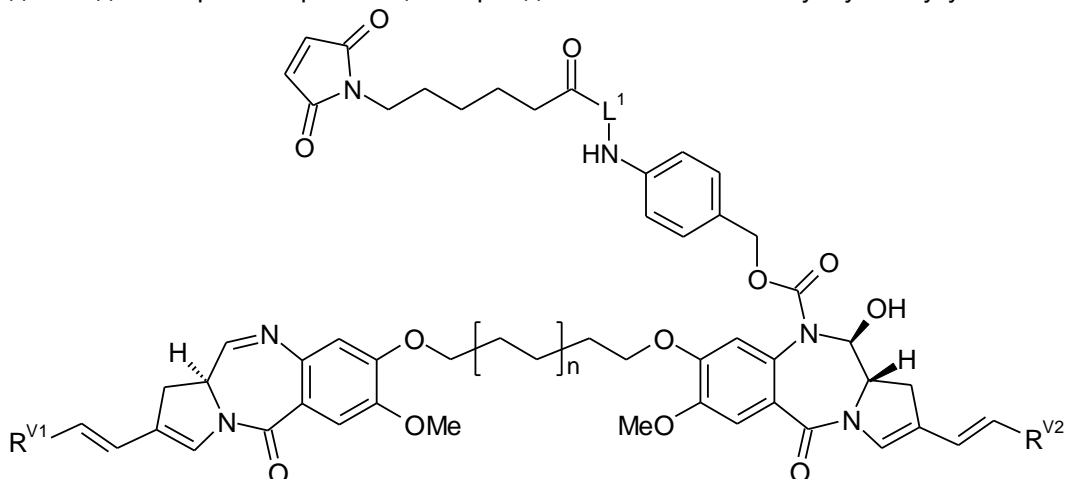
Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



5

де L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ag^1 та Ag^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 або 1.

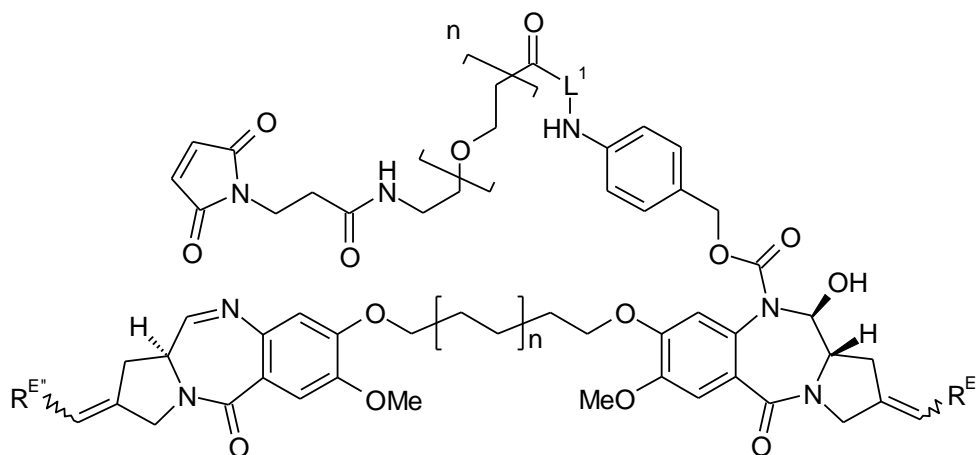
Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



10

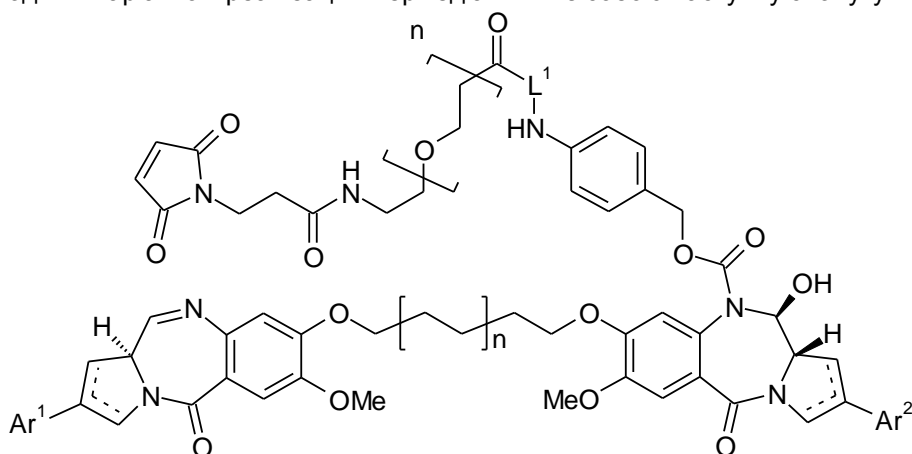
де L^1 є таким, як визначено раніше, і R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу та фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, і n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



де n дорівнює 0 або 1, L^1 є таким, як визначено раніше, і кожен із R^E та $R^{E'}$ незалежно вибраний із H або R^D .

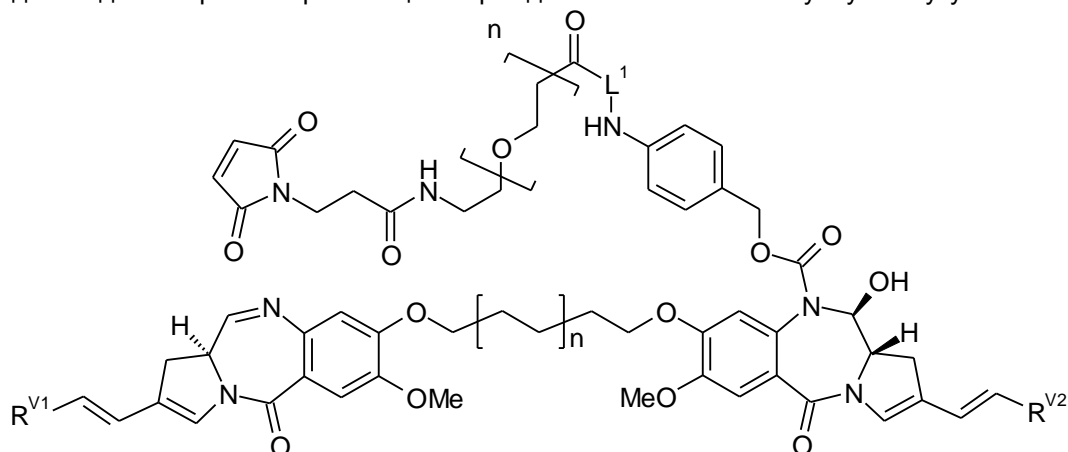
Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



5

де n дорівнює 0 або 1, L^1 є таким, як визначено раніше, кожен із Ar^1 та Ar^2 незалежно являє собою необов'язково заміщений C_{5-20} арил, і n дорівнює 0 або 1.

Згідно з одним варіантом реалізації інтермедіат являє собою наступну сполуку:



10

де L^1 є таким, як визначено раніше, і R^{V1} та R^{V2} незалежно вибрані з H, метилу, етилу та фенілу (причому зазначений феніл може необов'язково містити як замісник фтор, зокрема в положенні 4), та C_{5-6} гетероциклілу, і n дорівнює 0 або 1. R^{V1} та R^{V2} можуть бути однаковими або різними.

Замісники

15

У даному описі фраза "необов'язково заміщений" відноситься до початкової групи, яка може бути незаміщеною або заміщеною.

Якщо не вказано інше, термін "заміщений" у даному описі відноситься до початкової групи, яка містить один або більше замісників. Термін "замісник" використовується в даному описі в

загальноприйнятому сенсі й відноситься до хімічного фрагменту, який ковалентно приєднаний або, якщо це застосовно, сконденсований із початковою групою. Відомо безліч різних замісників, а також добре відомі способи їх утворення та введення в різні початкові групи.

Згідно з переважним варіантом реалізації замісники, описані в даній заявці (які включають необов'язкові замісники), обмежуються такими групами, що не є реакційноздатними з агентом, який зв'язується з клітинами. Зв'язок із агентом, який зв'язується з клітинами, в даному випадку утворюється через положення N10 PBD сполуки за допомогою лінкерної групи (яка містить, наприклад, L1, L2 та A). Реакційноздатні функціональні групи, розташовані на інших частинах PBD структури, можуть бути здатні утворювати додаткові зв'язки з агентом, який зв'язується з клітинами (що називається перехресним зв'язуванням). Зазначені додаткові зв'язки можуть змінювати транспорт та біологічну активність кон'югату. Отже, згідно з деякими варіантами реалізації додаткові замісники обмежуються замісниками, які не мають реакційноздатних функціональних груп.

Згідно з одним варіантом реалізації, замісники вибрані з групи, що складається з R, OR, SR, NRR", NO₂, галогену, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR та CONRR".

Згідно з одним варіантом реалізації, замісники вибрані з групи, що складається з R, OR, SR, NRR", NO₂, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR та CONRR".

Згідно з одним варіантом реалізації, замісники вибрані з групи, що складається з R, OR, SR, NRR", NO₂ та галогену.

Згідно з одним варіантом реалізації, замісники вибрані з групи, що складається з R, OR, SR, NRR" та NO₂.

Будь-який із варіантів реалізації винаходу, описаних вище, може застосовуватися для будь-якого із замісників, описаних у даній заявці. Альтернативно, замісники можуть бути вибрані з однієї або більше груп, перерахованих нижче.

Приклади замісників більш докладно описані нижче.

C₁₋₁₂ алкіл: Термін "C₁₋₁₂ алкіл" у даній заявці відноситься до моновалентного фрагменту, отриманого шляхом видалення атома водню від атома вуглецю вуглеводневої сполуки, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, який може бути аліфатичним або аліциклічним і який може бути насиченим або ненасиченим (наприклад, частково ненасиченим, повністю ненасиченим). Таким чином, термін "алкіл" включає підкласи алкеніл, алкініл, циклоалкіл і т.д., описані нижче.

Приклади насичених алкільних груп включають, але не обмежуються ними, метил (C₁), етил (C₂), пропіл (C₃), бутил (C₄), пентил (C₅), гексил (C₆) та гептил (C₇).

Приклади насичених лінійних алкільних груп включають, але не обмежуються ними, метил (C₁), етил (C₂), н-пропіл (C₃), н-бутил (C₄), н-пентил (аміл) (C₅), н-гексил (C₆) та н-гептил (C₇).

Приклади насичених розгалужених алкільних груп включають ізо-пропіл (C₃), ізо-бутил (C₄), втор-бутил (C₄), трет-бутил (C₄), ізо-пентил (C₅) та нео-пентил (C₅).

Алкільна група може необов'язково перериватися одним або більше гетероатомами, вибраними з O, N(H) і S. Зазначені групи можуть називатися "гетероалкілом".

C₂₋₂₀ гетероалкіл: Термін "C₂₋₁₂ гетероалкіл" в даній заявці відноситься до моновалентного фрагмента, отриманого шляхом видалення атома водню від атома вуглецю вуглеводневої сполуки, яка містить від 2 до 12 атомів вуглецю і один або більше гетероатомів, вибраних з O, N(H) і S, переважно O і S.

Приклади гетероалкільних груп включають, але не обмежуються ними, групи, які містять одну або більше ланок етиленгліколю типу -(OCH₂CH₂)-. Кінець гетероалкільної групи може являти собою основну форму гетероатома, наприклад, -OH, -SH або -NH₂. Згідно з переважним варіантом реалізації зазначений кінець являє собою -CH₃.

C₂₋₁₂ алкеніл: Термін "C₂₋₁₂ алкеніл" в даній заявці відноситься до алкільної групи, яка містить один або більше вуглець-вуглецевих подвійних зв'язків.

Приклади ненасичених алкенільних груп включають, але не обмежуються ними, етеніл (вініл -CH=CH₂), 1-пропеніл (-CH=CH-CH₃), 2-пропеніл (аліл -CH=CH=CH₂), ізопропеніл (1-метилвініл - (CH₃)=CH₂), бутеніл (C₄), пентеніл (C₅) та гексеніл (C₆).

C₂₋₁₂ алкініл: Термін "C₂₋₁₂ алкініл" в даній заявці відноситься до алкільної групи, яка містить один або більше вуглець-вуглецевих потрійних зв'язків.

Приклади ненасичених алкінільних груп включають, але не обмежуються ними, етиніл (-C≡CH) і 2-пропініл (пропаргіл -CH₂C≡CH).

C₃₋₁₂ циклоалкіл: Термін "C₃₋₁₂ циклоалкіл" в даній заявці відноситься до алкільної групи, яка також є циклічною групою; тобто моновалентного фрагмента, отриманого шляхом видалення атома водню від атома аліциклічного кільця циклічної вуглеводневої (карбоциклічної) сполуки, причому зазначений фрагмент містить від 3 до 7 атомів вуглецю, включаючи від 3 до 7 атомів кільця.

Приклади циклоалкільних груп включають, але не обмежуються ними, групи, отримані з:
насичених моноциклічних вуглеводневих сполук:

циклопропану (C₃), циклобутану (C₄), циклопентану (C₅), циклогексану (C₆), циклогептану (C₇), метилциклопропану (C₄), диметилциклопропану (C₅), метилциклобутану (C₅),
5 диметилциклобутану (C₆), метилциклопентану (C₆), диметилциклопентану (C₇) та метилциклогексану (C₇);

ненасичених моноциклічних вуглеводневих сполук:

циклопропену (C₃), циклобутену (C₄), циклопентену (C₅), циклогексену (C₆), метилциклопропену (C₄), диметилциклопропену (C₅), метилциклобутену (C₅),
10 диметилциклобутену (C₆), метилциклопентену (C₆), диметилциклопентену (C₇) та метилциклогексену (C₇); і

насичених поліциклічних вуглеводневих сполук:

норкарану (C₇), норпінану (C₇), норборнану (C₇).

C₃₋₂₀ гетероциклі: Термін "C₃₋₂₀ гетероциклі" в даній заявці відноситься до моновалентного
15 фрагмента, отриманого шляхом видалення атома водню від атома кільця гетероциклічної сполуки, причому зазначений фрагмент містить від 3 до 20 атомів у кільці, від 1 до 10 з яких являють собою гетероатоми кільця. Переважно кожне кільце містить від 3 до 7 атомів у кільці, від 1 до 4 атомів із яких являють собою гетероатоми кільця.

У зазначеному контексті префікси (наприклад, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆ і т.д.) позначають число атомів
20 у кільці або діапазон числа атомів у кільці, як атомів вуглецю, так і гетероатомів. Наприклад, термін "C₅₋₆ гетероциклі" в даній заявці відноситься до гетероциклічної групи, яка містить 5 або 6 атомів у кільці.

Приклади моноциклічних гетероциклічних груп включають, але не обмежуються ними, групи, отримані з:

25 N₁: азиридину (C₃), азетидину (C₄), піролідину (тетрагідропіролу) (C₅), піроліну (наприклад, 3-піроліну, 2,5-дигідропіролу) (C₅), 2Н-піролу або 3Н-піролу (ізопіролу, ізоазолу) (C₅), піперидину (C₆), дигідропіридину (C₆), тетрагідропіридину (C₆), азепіну (C₇);

O₁: оксирану (C₃), оксетану (C₄), оксолану (тетрагідрофурану) (C₅), оксолу (дигідрофурану) (C₅), оксану (тетрагідропірану) (C₆), дигідропірану (C₆), пірану (C₆), оксепіну (C₇);

30 S₁: тіірану (C₃), тіетану (C₄), тіолану (тетрагідротіофену) (C₅), тіану (тетрагідротіопірану) (C₆), тієпану (C₇);

O₂: диоксолану (C₅), диоксану (C₆) і диоксепану (C₇);

O₃: триоксану (C₆);

35 N₂: імідазолідину (C₅), піразолідину (діазолідину) (C₅), імідазоліну (C₅), піразоліну (дигідропіразолу) (C₅), піперазину (C₆);

N₁O₁: тетрагідрооксазолу (C₅), дигідрооксазолу (C₅), тетрагідроізоксазолу (C₅), дигідроізоксазолу (C₅), морфоліну (C₆), тетрагідрооксазину (C₆), дигідрооксазину (C₆), оксазину (C₆);

N₁S₁: тіазоліну (C₅), тіазолідину (C₅), тіоморфоліну (C₆);

40 N₂O₁: оксадіазину (C₆);

O₁S₁: оксатіолу (C₅) і оксатіану (тіоксану) (C₆); та,

N₁O₁S₁: оксатіазину (C₆).

Приклади заміщених моноциклічних гетероциклічних груп включають групи, отримані з
45 сахаридів у циклічній формі, наприклад, фуранози (C₅), такі як арабінофураноза, ліксофураноза, рибофураноза та ксилофураноза, і піранози (C₆), такі як алопіраноза, альтропіраноза, глюкопіраноза, манопіраноза, гулопіраноза, ідопіраноза, галактапіраноза та талопіраноза.

C₅₋₂₀ арил: Термін "C₅₋₂₀ арил" в даній заявці відноситься до моновалентного фрагмента,
50 отриманого шляхом видалення атома водню від атома ароматичного кільця ароматичної сполуки, причому зазначений фрагмент містить від 3 до 20 атомів у кільці. Переважно кожне кільце містить від 5 до 7 атомів у кільці.

У зазначеному контексті префікси (наприклад, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆ і т.д.) позначають число атомів
у кільці або діапазон числа атомів у кільці, як атомів вуглецю, так і гетероатомів. Наприклад, термін "C₅₋₆ арил" у даній заявці відноситься до арильної групи, яка містить 5 або 6 атомів у кільці.

55 Усі атоми в кільці можуть являти собою атоми вуглецю, як у "карбоарильних групах".

Приклади карбоарильних груп включають, але не обмежуються ними, групи, отримані з бензолу (тобто фенілу) (C₆), нафталіну (C₁₀), азулену (C₁₀), антрацену (C₁₄), фенантрени (C₁₄), нафтацену (C₁₈) та пірену (C₁₆).

60 Приклади арильних груп, які містять конденсовані кільця, щонайменше одне з яких являє собою ароматичне кільце, включають, але не обмежуються ними, групи, що походять із індану

(наприклад, 2,3-дигідро-1H-індену) (C_9), індену (C_9), ізоіндену (C_9), тетраліну (1,2,3,4-тетрагідронафталіну) (C_{10}), аценафтену (C_{12}), флуорену (C_{13}), феналену (C_{13}), ацефенантрену (C_{15}) та ацеантрену (C_{16}).

Альтернативно, атоми в кільці можуть включати один або більше гетероатомів, як у "гетероарильних групах". Приклади моноциклічних гетероарильних груп включають, але не обмежуються ними, групи, отримані з:

N_1 : піролу (азолу) (C_5), піридину (азину) (C_6);

O_1 : фурану (оксолу) (C_5);

S_1 : тіофену (тіолу) (C_5);

N_1O_1 : оксазолу (C_5), ізоксазолу (C_5), ізоксазину (C_6);

N_2O_1 : оксадіазолу (фуразану) (C_5);

N_3O_1 : оксатріазолу (C_5);

N_1S_1 : тіазолу (C_5), ізотіазолу (C_5);

N_2 : імідазолу (1,3-діазолу) (C_5), піразолу (1,2-діазолу) (C_5), піридазину (1,2-діазину) (C_6), піримідину (1,3-діазину) (C_6) (наприклад, цитозину, тиміну, урацилу), піразину (1,4-діазину) (C_6);

N_3 : триазолу (C_5), триазину (C_6); і

N_4 : тетразолу (C_5).

Приклади гетероарилів, які містять конденсовані кільця, включають, але не обмежуються ними:

C_9 (із 2 конденсованими кільцями), отримані з бензофурану (O_1), ізобензофурану (O_1), індолу (N_1), ізоіндолу (N_1), індолізіну (N_1), індоліну (N_1), ізоіндоліну (N_1), пурину (N_4) (наприклад, аденіну, гуаніну), бензімідазолу (N_2), індазолу (N_2), бензоксазолу (N_1O_1), бензизоксазолу (N_1O_1), бензодіоксолу (O_2), бензофуразану (N_2O_1), бензотріазолу (N_3), бензотіофурану (S_1), бензотіазолу (N_1S_1), бензотіадіазолу (N_2S);

C_{10} (із 2 конденсованими кільцями), отримані з хромену (O_1), ізохромену (O_1), хроману (O_1), ізохроману (O_1), бензодіоксану (O_2), хіноліну (N_1), ізохіноліну (N_1), хінолізіну (N_1), бензоксазину (N_1O_1), бензодіазину (N_2), піридопіридину (N_2), хіноксаліну (N_2), хіназоліну (N_2), циноліну (N_2), фталазину (N_2), нафтиридину (N_2), птеридину (N_4);

C_{11} (із 2 конденсованими кільцями), отримані з бензодіазепіну (N_2);

C_{13} (із 3 конденсованими кільцями), отримані з карбазолу (N_1), дибензофурану (O_1), дибензотіофену (S_1), карболіну (N_2), піримідину (N_2), піридоіндолу (N_2); та,

C_{14} (із 3 конденсованими кільцями), отримані з акридину (N_1), ксантену (O_1), тіоксантену (S_1), оксантрену (O_2), феноксатііну (O_1S_1), феназину (N_2), феноксазину (N_1O_1), фенотіазину (N_1S_1), тіантрену (S_2), фенантридину (N_1), фенантроліну (N_2), феназину (N_2).

Описані вище групи окремо або як частина іншого замісника можуть самі необов'язково містити як замісник одну або більше груп, вибраних із них самих та додаткових замісників, перерахованих нижче.

Галоген: -F, -Cl, -Br та -I.

Гідрокси: -OH.

Проста ефірна група: -OR, де R являє собою замісник простої ефірної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу (яка також називається C_{1-7} алкокси-групою, як описано нижче), C_{3-20} гетероциклільну групу (яка також називається C_{3-20} гетероциклілокси-групою) або C_{5-20} арильну групу (яка також називається C_{5-20} арилокси-групою), переважно C_{1-7} алкільну групу.

Алкокси: -OR, де R являє собою алкільну групу, наприклад, C_{1-7} алкільну групу. Приклади C_{1-7} алкокси-груп включають, але не обмежуються ними, -OMe (метокси), -OEt (етокси), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (ізопропокси), -O(nBu) (н-бутокси), -O(sBu) (втор-бутокси), -O(iBu) (ізобутокси) та -O(tBu) (трет-бутокси).

Ацеталь: -CH(OR¹)(OR²), де R¹ та R² незалежно являють собою замісники ацеталей, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу, або у випадку "циклічної" ацетальної групи R¹ та R² разом із двома атомами кисню, до яких вони приєднані, й атомами вуглецю, до яких вони приєднані, утворюють гетероциклічне кільце, яке містить від 4 до 8 атомів у кільці. Приклади ацетальних груп включають, але не обмежуються ними, -CH(OH)(OMe) та -CH(OH)(OEt).

Геміацеталь: -CH(OH)(OR¹), де R¹ являє собою замісник геміацеталю, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади геміацетальних груп включають, але не обмежуються ними, -CH(OH)(OMe) та -CH(OH)(OEt).

Кеталь: -CR(OR¹)(OR²), де R¹ та R² є такими, як визначено для ацеталей, і R являє собою замісник кеталю, відмінний від водню, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу

або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади кетальних груп включають, але не обмежуються ними, $-C(Me)(OMe)_2$, $-C(Me)(OEt)_2$, $-C(Me)(OMe)(OEt)$, $-C(Et)(OMe)_2$, $-C(Et)(OEt)_2$ та $-C(Et)(OMe)(OEt)$.

Гемікеталь: $-CR(OH)(OR^1)$, де R^1 є таким, як визначено для геміацеталей, і R являє собою замісник гемікеталю, відмінний від водню, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади геміацетальних груп включають, але не обмежуються ними, $-C(Me)(OH)(OMe)$, $-C(Et)(OH)(OMe)$, $-C(Me)(OH)(OEt)$, та $-C(Et)(OH)(OEt)$.

Оксо (кето, -он): $=O$.

Тіон (тіокетон): $=S$.

Іміно (імін): $=NR$, де R являє собою замісник іміногрупи, наприклад, водень, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно водень або C_{1-7} алкільну групу. Приклади складноефірних груп включають, але не обмежуються ними, $=NH$, $=NMe$, $=NEt$ та $=NPh$.

Форміл (карбальдегід, карбоксальдегід): $-C(=O)H$.

Ацил (кето): $-C(=O)R$, де R являє собою замісник ацильної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу (яка також називається C_{1-7} алкілацилом або C_{1-7} алканойлом), C_{3-20} гетероциклічну групу (яка також називається C_{3-20} гетероциклілацилом) або C_{5-20} арильну групу (яка також називається C_{5-20} арилацилом), переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади ацильних груп включають, але не обмежуються ними, $-C(=O)CH_3$ (ацетил), $-C(=O)CH_2CH_3$ (пропіоніл), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (трет-бутирил) та $-C(=O)Ph$ (бензоїл, фенол).

Карбокси (карбонова кислота): $C(=O)OH$.

Тіокарбокси (тіокарбонова кислота): $C(=S)SH$.

Тіолокарбокси (тіолокарбонова кислота): $C(=O)SH$.

Тіоноксид (тіоноксидна кислота): $C(=S)OH$.

Імідокислота: $-C(=NH)OH$.

Гідроксимова кислота: $-C(=NOH)OH$.

Складноефірна група (карбоксилат, складний ефір карбонової кислоти, оксикарбоніл): $-C(=O)OR$, де R являє собою замісник складноефірної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади складноефірних груп включають, але не обмежуються ними, $-(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ та $-C(=O)OPh$.

Ацилокси (обернений складний ефір): $-OC(=O)R$, де R являє собою замісник ацилокси-групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади ацилокси-груп включають, але не обмежуються ними, $-OC(=O)CH_3$ (ацетокси), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$ і $-OC(=O)CH_2Ph$.

Оксикарбоїлокси: $-OC(=O)OR$, де R являє собою замісник складноефірної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади складноефірних груп включають, але не обмежуються ними, $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ та $-OC(=O)OPh$.

Аміно: $-NR^1R^2$, де R^1 та R^2 незалежно являють собою замісники аміногруп, наприклад, водень, C_{1-7} алкільну групу (яка також називається C_{1-7} алкіламіно або ди- C_{1-7} алкіламіно), C_{3-20} гетероциклічну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно H або C_{1-7} алкільну групу, або у випадку "циклічної" аміногрупи R^1 та R^2 разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклічне кільце, яке містить від 4 до 8 атомів у кільці. Аміногрупи можуть бути первинними ($-NH_2$), вторинними ($-NHR^1$) або третинними ($-NHR^1R^2$) й у катіонній формі можуть бути четвертинними ($-N^+R^1R^2R^3$). Приклади аміногруп включають, але не обмежуються ними, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$ та $-NPh$. Приклади циклічних аміногруп включають, але не обмежуються ними, азиридино, азетидино, піролідін, піперидин, піперазин, морфоліно та тіоморфоліно.

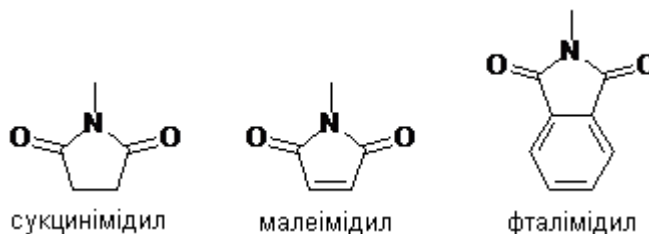
Амідо (карбамоїл, карбаміл, амінокарбоніл, карбоксамід): $-C(=O)NR^1R^2$, де R^1 та R^2 незалежно являють собою замісники аміногруп, як це визначено для аміногруп. Приклади амідних груп включають, але не обмежуються ними, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$ та $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, а також амідні групи, у яких R^1 та R^2 разом із атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклічну структуру, як, наприклад, у піперидинокарбонілі, морфолінокарбонілі, тіоморфолінокарбонілі та піперазинокарбонілі.

Тіоаміди (тіокарбаміл): $-C(=S)NR^1R^2$, де R^1 і R^2 незалежно являють собою замісники аміногруп, як це визначено для аміногруп. Приклади амідних груп включають, але не обмежуються ними, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ та $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

Ациламідо (ациламіно): $-NR^1C(=O)R^2$, де R^1 являє собою замісник амідної групи, наприклад,

водень, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно водень або C_{1-7} алкільну групу, і R^2 являє собою замісник ацильної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно водень або C_{1-7} алкільну групу. Приклади ациламідних груп включають, але не обмежуються ними, -

5 $NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$ та $-NHC(=O)Ph$. R^1 та R^2 разом можуть утворювати циклічну структуру, як, наприклад, у сукцинімідилі, малеїмідилі та фталімідилі:



сукцинімідил

малеїмідил

фталімідил

Амінокарбонілокси: $-OC(=O)NR^1R^2$, де R^1 та R^2 незалежно являють собою замісники аміногрупи, як це визначено для аміногрупи. Приклади амінокарбонілокси-груп включають, але

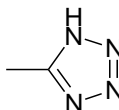
10 не обмежуються ними, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ та $-OC(=O)NEt_2$.

Уреїдо: $-N(R^1)CONR^2R^3$, де R^2 та R^3 незалежно являють собою замісники аміногрупи, як це визначено для аміногрупи, і R^1 являє собою замісник уреїдогрупи, наприклад, водень, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно водень або C_{1-7} алкільну групу. Приклади уреїдогруп включають, але не обмежуються ними, $-NHCONH_2$, -

15 $NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$ та $-NMeCONEt_2$.

Гуанідино: $-NH-C(=NH)NH_2$.

Тетразоліл: п'ятичленне ароматичне кільце, яке містить чотири атоми азоту та один атом вуглецю,



Іміно: $=NR$, де R являє собою замісник іміногрупи, наприклад, водень, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно H або C_{1-7} алкільну групу. Приклади іміногруп включають, але не обмежуються ними, $=NH$, $=NMe$ та $=NEt$.

Амідин (амідино): $-C(=NR)NR_2$, де кожна R являє собою замісник амідинової групи, наприклад, водень, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно H або C_{1-7} алкільну групу. Приклади амідинових груп включають, але не

25 обмежуються ними, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NH)NMe_2$ та $-C(=NMe)NMe_2$.

Нітро: $-NO_2$.

Нітрозо: $-NO$.

30 Азидо: $-N_3$.

Ціано (нітрил, карбонітрил): $-CN$.

Ізоціано: $-NC$.

Ціанато: $-OCN$.

Ізоціанато: $-NCO$.

35 Тіоціано (тіоціанато): $-SCN$.

Ізотіоціано (ізотіоціанато): $-NCS$.

Сульфгідрил (тіол, меркапто): $-SH$.

Тіоефір (сульфід): $-SR$, де R являє собою замісник тіоефірної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу (яка також називається C_{1-7} алкілтіогрупою), C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади C_{1-7} алкілтіогруп включають, але не

40 обмежуються ними, $-SCH_3$ та $-SCH_2CH_3$.

Дисульфід: $-SS-R$, де R являє собою замісник дисульфідної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу (яка також називається у даній заявці C_{1-7} алкілдисульфідом). Приклади C_{1-7} алкілдисульфідних груп

45 включають, але не обмежуються ними, $-SSCH_3$ та $-SSCH_2CH_3$.

Сульфін (сульфініл, сульфоксид): $-S(=O)R$, де R являє собою замісник сульфїнової групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфїнових груп включають, але не обмежуються ними, -

$S(=O)CH_3$ та $-S(=O)CH_2CH_3$.

50 Сульфон (сульфоніл): $-S(=O)_2R$, де R являє собою замісник сульфїнової групи, наприклад,

C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу, включаючи, наприклад, фторовану або перфторовану C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфонових груп включають, але не обмежуються ними, $-S(=O)_2CH_3$ (метансульфоніл, мезил), $-S(=O)_2CF_3$ (трифліл), $-S(=O)_2CH_2CH_3$ (езил), $-S(=O)_2C_4F_9$ (нонафліл), $-S(=O)_2CH_2CF_3$ (трезил), $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (таурил), $-S(=O)_2Ph$ (фенілсульфоніл, безил), 4-метилфенілсульфоніл (тозил), 4-хлорфенілсульфоніл (клозил), 4-бромфенілсульфоніл (брозил), 4-нітрофеніл (нозил), 2-нафталінсульфонат (напзил) та 5-диметиламінонафталін-1-ілсульфонат (данзил).

Сульфінмова кислота (сульфіно): $-S(=O)OH$, $-SO_2H$.

Сульфонова кислота (сульфо): $-S(=O)_2OH$, $-SO_3H$.

Сульфінат (складний ефір сульфінмової кислоти): $-S(=O)OR$; де R являє собою замісник сульфінатної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфінатних груп включають, але не обмежуються ними, $-S(=O)OCH_3$ (метоксисульфініл; метилсульфінат) та $-S(=O)OCH_2CH_3$ (етоксисульфініл; етилсульфінат).

Сульфонат (складний ефір сульфонової кислоти): $-S(=O)_2OR$, де R являє собою замісник сульфонатної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфонатних груп включають, але не обмежуються ними, $-S(=O)_2OCH_3$ (метоксисульфоніл; метилсульфонат) та $-S(=O)_2OCH_2CH_3$ (етоксисульфоніл; етилсульфонат).

Сульфінілокси: $-OS(=O)R$, де R являє собою замісник сульфінілокси-групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфінілокси-груп включають, але не обмежуються ними, $-OS(=O)CH_3$ та $-OS(=O)CH_2CH_3$.

Сульфонілокси: $-OS(=O)_2OR$, де R являє собою замісник сульфонілокси-групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфонілокси-груп включають, але не обмежуються ними, $-OS(=O)_2CH_3$ (мезилат) та $-OS(=O)_2CH_2CH_3$ (езилат).

Сульфат: $-OS(=O)_2OR$; де R являє собою замісник сульфатної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфатних груп включають, але не обмежуються ними, $-OS(=O)_2OCH_3$ та $-SO(=O)_2OCH_2CH_3$.

Сульфаміл (сульфамоіл; амід сульфінмової кислоти; сульфінамід): $-S(=O)NR^1R^2$, де R^1 та R^2 незалежно являють собою замісники для аміногруп, як це визначено для аміногруп. Приклади сульфамільних груп включають, але не обмежуються ними, $-S(=O)NH_2$, $-S(=O)NH(CH_3)$, $-S(=O)N(CH_3)_2$, $-S(=O)NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)N(CH_2CH_3)_2$ та $-S(=O)NHPh$.

Сульфонамідо (сульфінамідо; амід сульфонової кислоти; сульфонамід): $-S(=O)_2NR^1R^2$, де R^1 та R^2 незалежно являють собою замісники для аміногруп, як це визначено для аміногруп. Приклади сульфонамідних груп включають, але не обмежуються ними, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2NH(CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_3)_2$, $-S(=O)_2NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_2CH_3)_2$ та $-S(=O)_2NHPh$.

Сульфаміно: $-NR^1S(=O)_2OH$, де R^1 являє собою замісник аміногрупи, як це визначено для аміногруп. Приклади сульфаміногруп включають, але не обмежуються ними, $-NHS(=O)_2OH$ та $-N(CH_3)S(=O)_2OH$.

Сульфонаміно: $-NR^1S(=O)_2R$, де R^1 являє собою замісник аміногрупи, як це визначено для аміногруп, і R являє собою замісник сульфонаміногрупи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфонаміногруп включають, але не обмежуються ними, $-NHS(=O)_2CH_3$ та $-N(CH_3)S(=O)_2C_6H_5$.

Сульфінаміно: $-NR^1S(=O)R$, де R^1 являє собою замісник аміногрупи, як це визначено для аміногруп, і R являє собою замісник сульфінаміно-групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу. Приклади сульфінаміногруп включають, але не обмежуються ними, $-NHS(=O)CH_3$ та $-N(CH_3)S(=O)C_6H_5$.

Фосфіно (фосфін): $-PR_2$, де R являє собою замісник фосфіногрупи, наприклад, -H, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфіногруп включають, але не обмежуються ними, $-PH_2$, $-P(CH_3)_2$, $-P(CH_2CH_3)_2$, $-P(t-Bu)_2$ та $-P(Ph)_2$.

Фосфо: $-P(=O)_2$.

Фосфініл (фосфіноксид): $-P(=O)R_2$, де R являє собою замісник фосфінільної групи, наприклад, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфінільних груп включають, але не обмежуються ними, $-P(=O)(CH_3)_2$, $-P(=O)(CH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(t-Bu)_2$ та $-P(=O)(Ph)_2$.

Фосфонова кислота (фосфоно): $-P(=O)(OH)_2$.

Фосфонат (складний ефір фосфоногрупи): $-P(=O)(OR)_2$, де R являє собою замісник фосфонатної групи, наприклад, -H, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфонатних груп включають, але не обмежуються ними, $-P(=O)(OCH_3)_2$, $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(O-t-Bu)_2$ та $-P(=O)(OPh)_2$.

Фосфорна кислота (фосфоноокси): $-OP(=O)(OH)_2$.

Фосфат (складний ефір фосфоноокси-групи): $-OP(=O)(OR)_2$, де R являє собою замісник фосфатної групи, наприклад, -H, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфатних груп включають, але не обмежуються ними, $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)(O-t-Bu)_2$ та $-OP(=O)(OPh)_2$.

Фосфориста кислота: $-OP(OH)_2$.

Фосфіт: $-OP(OR)_2$, де R являє собою замісник фосфітної групи, наприклад, -H, C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфітних груп включають, але не обмежуються ними, $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O-t-Bu)_2$ та $-OP(OPh)_2$.

Фосфорамідит: $-OP(OR^1)-NR^2_2$, де R^1 і R^2 являють собою замісники фосфорамідитної групи, наприклад, -H, (необов'язково заміщену) C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфорамідитних груп включають, але не обмежуються ними, $-OP(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)-N(i-Pr)_2$ та $-OP(OCH_2CH_2CN)-N(i-Pr)_2$.

Фосфорамідат: $-OP(=O)(OR^1)-NR^2_2$, де R^1 і R^2 являють собою замісники фосфорамідатної групи, наприклад, -H, (необов'язково заміщену) C_{1-7} алкільну групу, C_{3-20} гетероциклільну групу або C_{5-20} арильну групу, переважно -H, C_{1-7} алкільну групу або C_{5-20} арильну групу. Приклади фосфорамідатних груп включають, але не обмежуються ними, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(i-Pr)_2$ та $-OP(=O)(OCH_2CH_2CN)-N(i-Pr)_2$.

Алкіль

C_{3-12} алкіль: Термін " C_{3-12} алкіль" у даній заявці відноситься до бідентатного фрагменту, отриманого шляхом видалення двох атомів водню або від одного й того ж атома вуглецю, або по одному від кожного з двох різних атомів вуглецю вуглеводневої сполуки, яка містить від 3 до 12 атомів вуглецю (якщо не вказано інше), який може бути аліфатичним або аліциклічним та який може бути насиченим, частково ненасиченим або повністю ненасиченим. Таким чином, термін "алкіль" включає підкласи алкенілен, алкінілен, циклоалкіль і т.д., описані нижче.

Приклади лінійних насичених C_{3-12} алкіленових груп включають, але не обмежуються ними, $-(CH_2)_n-$, де n дорівнює цілому числу від 3 до 12, наприклад, $-CH_2CH_2CH_2-$ (пропілен), $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (бутилен), $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (пентилен) та $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (гептилен).

Приклади розгалужених насичених C_{3-12} алкіленових груп включають, але не обмежуються ними, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$ та $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$.

Приклади лінійних частково ненасичених C_{3-12} алкіленових груп (C_{3-12} алкеніленових та алкініленових груп) включають, але не обмежуються ними, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2CH=CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-$ та $-CH_2-C\equiv C-CH_2-$.

Приклади розгалужених частково ненасичених C_{3-12} алкіленових груп (C_{3-12} алкеніленових та алкініленових груп) включають, але не обмежуються ними, $-C(CH_3)=CH-$, $-C(CH_3)=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH(CH_3)-$ та $-C\equiv C-CH(CH_3)-$.

Приклади аліциклічних насичених C_{3-12} алкіленових груп (C_{3-12} циклоалкіленів) включають, але не обмежуються ними, циклопентилен (наприклад, циклопент-1,3-ілен) та циклогексилен (наприклад, циклогекс-1,4-ілен).

Приклади аліциклічних частково ненасичених C_{3-12} алкіленових груп (C_{3-12} циклоалкіленів) включають, але не обмежуються ними, циклопентенілен (наприклад 4-циклопентен-1,3-ілен), циклогексенілен (наприклад 2-цилогексен-1,4-ілен; 3-цилогексен -1,2-ілен; 2,5-цилогексадіен-1,4-ілен).

Інші форми

Якщо не вказано інше, зазначені вище приклади включають добре відомі йонні форми, форми солей, сольватів та захищені форми зазначених замісників. Наприклад, вказівка на карбонову кислоту ($-COOH$) також включає аніонну (карбоксилатну) форму ($-COO^-$), сіль або сольват, а також традиційні захищені форми. Аналогічно, вказівка на аміногрупу включає протоновану форму ($-N^+HR^1R^2$), сіль або сольват аміногрупи, наприклад, гідрохлоридну сіль, а

також традиційні захищені форми аміногрупи. Аналогічно, вказівка на гідроксильну групу також включає аніонну форму ($-O^-$), сіль або сольват, а також традиційні захищені форми.

Солі

Може бути зручним або бажаним отримувати, очищати і/або обробляти відповідну сіль активної сполуки, наприклад, фармацевтично прийнятну сіль. Приклади фармацевтично прийнятних солей описані в джерелі Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Наприклад, якщо сполука є аніонною або містить функціональну групу, яка може бути аніонною (наприклад, $-COOH$ може являти собою $-COO^-$), то може відбуватися утворення солі з підходящим катіоном. Приклади підходящих неорганічних катіонів включають, але не обмежуються ними, йони лужних металів, такі як Na^+ та K^+ , катіони лужноземельних металів, такі як Ca^{2+} та Mg^{2+} , та інші катіони, такі як Al^{3+} . Приклади підходящих органічних катіонів включають, але не обмежуються ними, йон амонію (тобто NH_4^+) та заміщені йони амонію (наприклад, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Приклади деяких підходящих заміщених йонів амонію являють собою йони, отримані з: етиламіну, диетиламіну, дициклогексиламіну, триетиламіну, бутиламіну, етилендіаміну, етаноламіну, диетаноламіну, піперазину, бензиламіну, фенілбензиламіну, холіну, меглуміну та триметаміну, а також амінокислот, таких як лізин та аргінін. Приклад звичайного йона четвертинного амонію являє собою $N(CH_3)_4^+$.

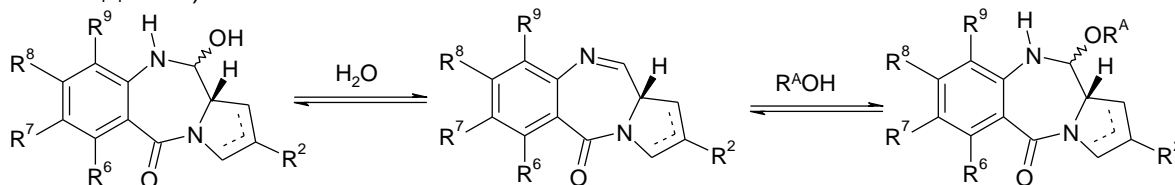
Якщо сполука є катіонною або містить функціональну групу, яка може бути катіонною (наприклад, $-NH_2$ може являти собою $-NH_3^+$), то може відбуватися утворення солі з підходящим аніоном. Приклади підходящих неорганічних аніонів включають, але не обмежуються ними, аніони, отримані з наступних неорганічних кислот: соляної, бромоводневої, йодоводневої, сірчаної, сірчистої, азотної, азотистої, фосфорної та фосфористої.

Приклади підходящих органічних аніонів включають, але не обмежуються ними, аніони, отримані з наступних органічних кислот: 2-ацетилоксibenзойної, оцтової, аскорбінової, аспарагінової, бензойної, камфоросульфонової, коричної, лимонної, етилендіамінтетраоцтової, етандисульфонової, етансульфонової, фумарової, глюкөгептонової, глюконової, глутамінової, гліколевої, гідроксималеїнової, гідроксинафталінкарбонової, ізетіонової, молочної, лактобіонової, лауринової, малеїнової, яблучної, метансульфонової, муцинової, олеїнової, щавлевої, пальмітинової, памоївої, пантотенової, фенілоцтової, фенілсульфонової, пропіонової, піровиноградної, саліцилової, стеаринової, сукцинової, сульфанілової, винної, толуолсульфонової, трифтороцтової кислоти та валеріанової. Приклади підходящих полімерних органічних аніонів включають, але не обмежуються ними, аніони, отримані з наступних полімерних кислот: таніну, карбоксиметилцелюлози.

Сольвати

Може бути зручним або бажаним отримувати, очищати і/або обробляти відповідний сольват активної сполуки. Термін "сольват" використовується в даному описі в загальноприйнятому сенсі для вказівки на комплекс розчиненої речовини (наприклад, активної сполуки, солі активної сполуки) та розчинника. Якщо розчинник являє собою воду, сольват може в загальноприйнятому сенсі називатися гідратом, наприклад, моногідратом, дигідратом, тригідратом і т.д.

Даний винахід включає сполуки, в яких розчинник приєднується через імінний зв'язок PBD фрагмента, що показано нижче, де розчинник являє собою воду або спирт ($R^A OH$, де R^A являє собою C_{1-4} алкіл):



Зазначені форми можуть називатися карбіноламініними та карбіноламінефірними формами PBD (як описано в розділі, що відноситься до R^{10} , як зазначено вище). Рівновага зазначеного оборотного процесу залежить від станів, в яких зазначені сполуки виявлені, а також природи самого фрагменту.

Зазначені конкретні сполуки можуть бути виділені в твердому вигляді, наприклад, шляхом ліофілізації.

Ізомери

Конкретні сполуки згідно з даним винаходом можуть існувати в одній або більше певних геометричних, оптичних, енантіомерних, діастереомерних, епімерних, атропових, стереоізомерних, таутомерних, конформаційних або аномерних формах, включаючи, але не обмежуючись ними, цис- та транс-форми; E- та Z-форми; c-, t- та g-форми; ендо- та екзо-форми;

R-, S-, та мезо-форми; D- та L-форми; d- та l-форми; (+) та (-) форми; кето-, енол- та енолат-форми; сін- та анти-форми; синклінальні і антиклінальні форми; α та β -форми; аксіальні та екваторіальні форми; форму ванни, крісла, твіст-форму, форму конверту та напівкрісла, та їх комбінації, які в даній заявці разом називаються "ізомерами" (або "ізомерними формами").

5 Термін "хіральний" відноситься до молекул, які мають властивість не співпадати при накладенні дзеркальних відображень партнерів, тоді як термін "ахіральний" відноситься до молекул, які співпадають при накладанні дзеркальних відображень партнерів.

Термін "стереоізомери" належить до сполук, які мають однаковий хімічний склад, але відрізняються з точки зору організації атомів або груп у просторі.

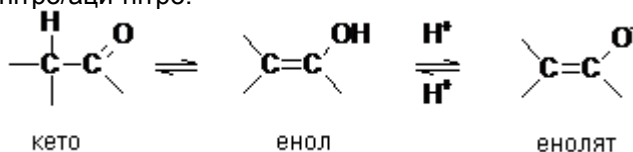
10 Термін "діастереомери" відноситься до стереоізомеру з двома або більше центрами хіральності, молекули якого не є дзеркальними відображеннями одна одної. Діастереомери мають різні фізичні властивості, наприклад, температуру плавлення, температуру кипіння, спектральні властивості та реакційну здатність. Суміші діастереомерів можна розділити за допомогою аналітичних методів з високою роздільною здатністю, таких як електрофорез та хроматографія.

15 Термін "енантіомери" відноситься до двох стереоізомерів сполуки, які не збігаються при накладанні дзеркальних відображень одне на одне.

Визначення та позначення стереохімічних структур, які використовуються в даній заявці, в цілому наведені відповідно до S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Сполуки згідно з даним винаходом можуть містити асиметричні або хіральні центри і тому існувати в різних стереоізомерних формах. Припускається, що всі стереоізомерні форми сполук згідно з даним винаходом, включаючи, але не обмежуючись ними, діастереомери, енантіомери та атропоізомери, а також їх суміші, такі як рацемічні суміші, є частиною даного винаходу. Багато органічних сполук існують у оптично активних формах, тобто здатні обертати площину плоско-поляризованого світла. При описі оптично активних сполук префікси D та L або R та S використовуються для позначення абсолютної конфігурації молекули відносно її хіального центру (центрів). Префікси d та l або (+) та (-) використовуються для позначення знака напрямку обертання площини плоско-поляризованого світла сполукою, при цьому (-) або l означає, що сполука є лівообертаючою. Сполука з префіксом (+) або d є правообертаючою. З точки зору певної хімічної структури зазначені стереоізомери є ідентичними, за винятком того, що вони є дзеркальними відображеннями один одного. Певний стереоізомер може також називатися енантіомером, а суміш таких ізомерів часто називається енантіомерною сумішшю. Суміш енантіомерів 50:50 називається рацемічною сумішшю або рацематом, який може утворюватися за відсутності стереоселекції або стереоспецифічності в процесі хімічної реакції або технологічному процесі. Терміни "рацемічна суміш" та "рацемат" відносяться до еквімолярної суміші двох енантіомерних форм, позбавленої оптичної активності.

40 Необхідно відзначити, що, за винятком описаного нижче для таутомерних форм, спеціально виключених із терміну "ізомери", в даній заявці представлені структурні (або конституційні) ізомери (тобто ізомери, які розрізняються за зв'язками між атомами, а не просто за положенням атомів у просторі). Наприклад, вказівку на метокси-групу $-\text{OCH}_3$ не слід розглядати як вказівку на її структурний ізомер гідроксиметильну групу $-\text{CH}_2\text{OH}$. Аналогічно, вказівку на орто-хлорфеніл не слід розглядати як вказівку на його структурний ізомер мета-хлорфеніл. Однак вказівка на клас структур може включати структурні ізомерні форми, які входять до зазначеного класу (наприклад, C_{1-7} алкіл включає n-пропіл та ізо-пропіл; бутіл включає n-, ізо-, втор- та трет-бутіл; метоксифеніл включає орто-, мета- та пара-метоксифеніл).

45 Наведені вище винятки не відносяться до таутомерних форм, наприклад, кето-, енол- та енолат-форм, як, наприклад, у наступних таутомерних парах: кето/еноли (показаних нижче), імін/енамін, амід/іміноспирт, амідин/амідин, нітрат/оксим, тіокетон/енетіол, N-нітрат/гідроксиазо та нітро/аци-нітро.



55 Термін "таутомер" або "таутомерна форма" відноситься до структурних ізомерів із різною енергією, які є такими, що взаємоперетворюються при проходженні через низькоенергетичний бар'єр. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) піддаються взаємоперетворенням, опосередкованим міграцією протона, таким як кето-енольна та імін-

енамінна ізомеризація. Валентні таутмери піддаються взаємоперетворенням за рахунок перерозподілу деяких із зв'язуючих електронів.

Необхідно відзначити, що до терміну "ізомер" спеціально включені сполуки з одним або більше ізотопними замісниками. Наприклад, Н може бути представлений будь-якою ізотопною формою, включаючи ^1H , ^2H (D) та ^3H (T); С може бути представлений будь-якою ізотопною формою, включаючи ^{12}C , ^{13}C та ^{14}C ; О може бути представлений будь-якою ізотопною формою, включаючи ^{16}O та ^{18}O і т.д.

Приклади ізотопів, які можуть бути включені до сполук згідно з даним винаходом, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, фтору та хлору, включаючи, але не обмежуючись ними, ^2H (дейтерій, D), ^3H (тритій), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl та ^{125}I . Включені різні мічені ізотопом сполуки згідно з даним винаходом, наприклад, сполуки, до яких введені радіоактивні ізотопи, такі як ^3H , ^{13}C та ^{14}C . Такі ізотопно-мічені сполуки можуть застосовуватися в метаболічних дослідженнях, дослідженнях кінетики реакцій, методах визначення або візуалізації, таких як позитронно-емісійна томографія (PET) або однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (SPECT), включаючи аналіз розподілу в тканині лікарського засобу чи субстрату, або лікуванні пацієнтів радіоактивними сполуками. Мічені або заміщені на дейтерій терапевтичні сполуки згідно з даним винаходом можуть мати поліпшені властивості DMPK (метаболізму і фармакокінетики лікарського засобу), які відносяться до розподілу, метаболізму та виведення (ADME). Заміщення важкими ізотопами, такими як дейтерій, може надавати певні терапевтичні переваги, які проявляються в більшій метаболічній стабільності, наприклад, підвищення періоду напіввиведення *in vivo* або зниження необхідної дози. Мічені ^{18}F сполуки можуть бути застосовними для PET або SPECT досліджень. Мічені ізотопами сполуки згідно з даним винаходом та їх проліки можуть в цілому бути отримані через здійснення описаних нижче процедур, схем, прикладів і способів приготування, шляхом введення замісника, такого як немічений ізотопом реагент, замість легко доступного міченого ізотопом реагента. Крім того, заміщення важкими ізотопами, зокрема дейтерієм (тобто ^2H або D), може надавати певні терапевтичні переваги, які проявляються в більшій метаболічній стабільності, наприклад, підвищення періоду напіввиведення *in vivo* або зниження необхідної дози або покращення терапевтичного індексу. Очевидно, що дейтерій у зазначеному контексті розглядається як замісник. Концентрація такого важкого ізотопу, зокрема дейтерію, може бути визначена за допомогою коефіцієнта збагачення ізотопом. Мається на увазі, що в сполуках згідно з даним винаходом будь-який атом, спеціально не позначений як конкретний ізотоп, позначає будь-який стабільний ізотоп зазначеного атома.

Якщо не вказано інше, вказівка на певну сполуку включає всі такі ізомерні форми, в тому числі (повністю або частково) рацемічні та інші їх суміші. Способи отримання (наприклад, асиметричний синтез) та розділення (наприклад, фракційна кристалізація та хроматографічні способи) зазначених ізомерних форм або відомі в даній області техніки, або з легкістю можуть бути відомим чином отримані шляхом адаптації способів, описаних у даній заявці, або інших відомих способів.

Біологічна активність

Аналізи клітинної проліферації *in vitro*

У цілому, цитотоксичну або цитостатичну активність кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC) визначають шляхом: дії на клітини ссавців, які мають рецепторні білки, наприклад, HER2, ADC антитіла в культуральному середовищі; культивування клітин протягом періоду від приблизно 6 годин до приблизно 5 днів та вимірювання клітинної життєздатності. Клітинні аналізи в пробірці використовують для визначення життєздатності (проліферації), цитотоксичності та індукції апоптозу (активації каспаз) ADC згідно з даним винаходом.

Активність кон'югату антитіло-лікарський засіб *in vitro* можна виміряти за допомогою аналізу клітинної проліферації. Люмінесцентний аналіз життєздатності клітин CellTiter-Glo[®] являє собою комерційно доступний (Promega Corp, Медисон, Вісконсін, США) метод гомогенного аналізу, оснований на експресії рекомбінантної люциферази світляка Coleoptera (патенти США US 5583024, 5674713 та 5700670). За допомогою зазначеного аналізу клітинної проліферації визначають число життєздатних клітин в культурі на основі кількісної оцінки присутнього АТФ як індикатора метаболічно активних клітин (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677). Аналіз CellTiter-Glo[®] проводили в 96-лункових планшетах з можливістю автоматизованого високопродуктивного скринінгу (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Процедура гомогенного аналізу включає додавання єдиного реагента (CellTiter-Glo[®]) безпосередньо до клітин, культивованих у середовищі з додаванням сироватки. Етапи промивання клітин, видалення середовища і багаторазового піпетування не потрібні. Система виявляє до 15 клітин/лунку в 384-лункових планшетах через 10 хвилин після додавання

реагента і перемішування. Клітини можна безперервно обробляти ADC або ж їх можна обробляти і видаляти ADC. У цілому, клітини, які обробляли протягом короткого часу, тобто протягом 3 годин, показали таку ж ефективну активність, як і клітини, які обробляли безперервно.

Гомогенний аналіз "додавання-змішування-вимірювання" призводив до лізису клітин і генерації люмінесцентного сигналу, пропорційного кількості присутнього АТФ. Кількість АТФ прямо пропорційна кількості клітин, присутніх у культурі. У процесі проведення аналізу CellTiter-Glo® генерується люмінесцентний сигнал "накалювання" в результаті реакції люциферази, період напівжиття якої в цілому становить більше п'яти годин, в залежності від використовуваного типу клітин і середовища. Кількість життєздатних клітин виражають у відносних одиницях люмінесценції (RLU). Субстрат, люциферин жука, піддається окисному декарбокислюванню рекомбінантної люциферази світляка із супутнім перетворенням АТФ у АМФ і генерацією фотонів.

Ефективність *in vivo*

Ефективність *in vivo* кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC) згідно з даним винаходом можна визначити за допомогою досліджень ксенотрансплантату пухлини у мишей. Наприклад, *in vivo* ефективність анти-HER2 ADC згідно з даним винаходом можна визначити з використанням моделі трансгенних мишей, які містять експлантати, з підвищеною експресією HER2. Алогенний трансплантат отримували з трансгенної миші Fo5 mmtv, яка не відповідає або слабо відповідає на терапію з використанням герцептину (HERCEPTIN®). Тваринам одноразово вводили ADC певної дози (мг/кг) й певного впливу PBD лікарського засобу (мкг/м2); та контрольний буфер-плацебо (розріджувач) і спостерігали мишей протягом двох тижнів або більше з метою визначення часу збільшення пухлини в два рази, десятичного логарифма клітинної загибелі та зменшення розміру пухлини.

Застосування

Кон'югати згідно з даним винаходом можуть використовуватися для отримання PBD сполук у області-мішені.

Область-мішень переважно являє собою популяцію проліферуючих клітин. Антитіло являє собою антитіло для антигена, присутнього в популяції проліферуючих клітин.

Згідно з одним варіантом реалізації антиген відсутній або присутній на зниженому рівні в непроліферуючій клітинній популяції в порівнянні з кількістю антигена, присутнього в проліферуючій клітинній популяції, наприклад, популяції пухлинних клітин.

У області-мішені лінкер може розщеплюватися таким чином, що сполука формули (D) вивільнюється. Таким чином, кон'югат може використовуватися для селективного забезпечення сполуки формули (D) в області-мішені.

Лінкер може розщеплюватися ферментом, присутнім у області-мішені.

Область-мішень може являє собою вказану область *in vitro*, *in vivo* або *ex vivo*.

Сполуки, що являють собою кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC) згідно з даним винаходом, включають сполуки, які надають протиракову дію. Зокрема, сполуки включають антитіло, кон'юговане, тобто ковалентно зв'язане за допомогою лінкера, з фрагментом PBD лікарського засобу, тобто токсином. Коли лікарський засіб не кон'югований із антитілом, вказаний PBD лікарський засіб має цитотоксичну дію. Біологічна активність фрагмента PBD лікарського засобу, таким чином, модулюється шляхом кон'югування з антитілом. Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) згідно з даним винаходом селективно доставляє ефективну дозу цитотоксичного агента до тканини пухлини, в результаті чого може досягатися велика селективність, тобто більш низька ефективна доза.

Таким чином, згідно з одним аспектом даного винаходу, запропонована сполука, яка являє собою кон'югат, як описано в даній заявці, для застосування в терапії.

Згідно з іншим аспектом також запропонована сполука, яка являє собою кон'югат, як описано в даній заявці, для застосування при лікуванні проліферативного захворювання. Згідно з другим аспектом даного винаходу запропоноване застосування сполуки, яка являє собою кон'югат, при виготовленні лікарського засобу для лікування проліферативного захворювання.

Середній фахівець у даній області техніки з легкістю визначить, чи здатний імовірний кон'югат лікувати проліферативний стан для будь-якого конкретного типу клітин. Наприклад, випробування, які можуть зручно використовуватися для оцінки активності, забезпечуваної певною сполукою, описані в прикладах нижче.

Термін "проліферативне захворювання" відноситься до небажаної або неконтрольованої проліферації надлишкових або аномальних клітин, яка є небажаною, такої як неопластичне або гіперпластичне зростання, як *in vitro*, так і *in vivo*.

Приклади проліферативних станів включають, але не обмежуються ними, доброякісну,

передракову та злоякісну проліферацію клітин, включаючи, але не обмежуючись ними, неоплазми й пухлини (наприклад, гістоцитому, гліому, астроцитому, остеому), ракові захворювання (наприклад, рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, рак шлунково-кишкового тракту, колоректальний рак, рак товстої кишки, рак молочної залози, рак яєчників, рак передміхурової залози, рак яєчок, рак печінки, рак нирки, рак сечового міхура, рак підшлункової залози, рак мозку, саркому, остеосаркому, саркому Капоші, меланому), лейкози, псоріаз, захворювання кісток, фібропроліферативні розлади (наприклад, сполучних тканин) і атеросклероз. Ракові захворювання, які представляють особливий інтерес, включають, але не обмежуються ними, лейкози і рак яєчників.

Можна лікувати клітини будь-якого типу, включаючи, але не обмежуючись ними, клітини легенів, шлунково-кишкового тракту (включаючи, наприклад, клітини кишечника, клітини товстої кишки), молочної залози (мамарні), яєчників, передміхурової залози, печінки (печінкові), нирки (ниркові), сечового міхура, підшлункової залози, мозку та шкіри.

Згідно з одним варіантом реалізації, лікування являє собою лікування раку підшлункової залози.

Згідно з одним варіантом реалізації, лікування являє собою лікування пухлини, на поверхні клітин якої є $\alpha_v\beta_6$ інтегрин.

Припускається, що кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) згідно з даним винаходом може застосовуватися при лікуванні різних захворювань або розладів, які, наприклад, характеризуються гіперекспресією пухлинного антигена. Приклади станів або гіперпроліферативних захворювань включають доброякісні або злоякісні пухлини; лейкоз, гематологічні та лімфоїдні лейкози. Інші приклади включають нейрональні, гліальні, астроцитарні, гіпоталамічні, ендокринні, макрофагальні, епітеліальні, стромальні, бластоцельні, запальні, ангіогенні та імунологічні, включаючи аутоімунні, розлади.

У цілому, захворювання або розлад, що піддається лікуванню, являє собою гіперпроліферативне захворювання, таке як рак. Приклади раку, що піддається лікуванню, згідно з даним описом включають, але не обмежуються ними, карциному, лімфому, бластому, саркому й лейкоз або лімфолейкози. Більш конкретні приклади зазначених ракових захворювань включають плоскоклітинний рак (наприклад, епітеліальний плоскоклітинний рак), рак легенів, включаючи дрібноклітинний рак легенів, недрібноклітинний рак легенів, аденокарциному легенів і плоскоклітинну карциному легенів, рак очеревини, гепатоклітинний рак, гастральний рак, або рак шлунка, включаючи рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліобластому, цервікальний рак, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатит, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої кишки, колоректальний рак, карциному ендометрію або матки, карциному слинної залози, рак нирки, або ренальний рак, рак передміхурової залози, рак піхви, рак щитовидної залози, гепатокарциному, карциному заднього проходу, пеніальну карциному, а також рак голови та шиї.

Аутоімунні захворювання, для лікування яких можуть застосовуватися ADC сполуки, включають ревматоїдні розлади (такі як, наприклад, ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, склеродермію, вовчак, такий як системний червоний вовчак (SLE) і вовчаковий нефрит, поліміозит/дерматоміозит, кріоглобулінемія, синдром антифосфоліпідних антитіл і псоріатичний артрит), остеоартрит, аутоімунні розлади шлунково-кишкового тракту і печінки (такі як, наприклад, запальні захворювання кишечника (наприклад, виразковий коліт і хвороба Крона), аутоімунний гастрит і перніціозна анемія, аутоімунний гепатит, первинний біліарний цироз, первинний склерозуючий холангіт та целиакія), васкуліт (такий як, наприклад, ANCA (антинейтрофільні цитоплазматичні антитіла)-асоційований васкуліт, включаючи синдром Черджа-Строса, гранулематоз Вегенера і поліартеріїт), аутоімунні неврологічні розлади (такі як, наприклад, розсіяний склероз, синдром опсоклонус-міоклонус, міастенія гравіс, оптиконейромієліт, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера та аутоімунні поліневропатії), ниркові розлади (такі як, наприклад, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера й хвороба Бергера), аутоімунні дерматологічні розлади (такі як, наприклад, псоріаз, кропив'янка, алергічний висип, звичайна пухирчатка, бульозний пемфігоїд та шкірний червоний вовчак), гематологічні розлади (такі як, наприклад, тромбоцитопенічна пурпура, тромбоцитна пурпура, посттрансфузійна пурпура та аутоімунна гемолітична анемія), атеросклероз, увеїт, аутоімунні розлади слуху (такі як, наприклад, захворювання внутрішнього вуха та втрата слуху), синдром Бехчета, синдром Рейно, трансплантація органів і аутоімунні ендокринні розлади (такі як, наприклад, пов'язані з діабетом аутоімунні захворювання, такі як інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM), хвороба Аддісона, та аутоімунні захворювання щитовидної залози (наприклад, хвороба Гравеса та тиреоїдит)). Більш переважно зазначені захворювання включають, наприклад, ревматоїдний артрит, виразковий коліт, ANCA-

асоційований васкуліт, вовчанку, розсіяний склероз, синдром Шегрена, хворобу Гравесу, IDDM, перніціозну анемію, тиреоїдит та гломерулонефрит.

Способи лікування

Кон'югати згідно з даним винаходом можуть використовуватися в способах терапії. Також запропонований спосіб лікування, який включає введення суб'єкту, що потребує зазначеного лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки, яка являє собою кон'югат, згідно з даним винаходом. Термін "терапевтично ефективна кількість" позначає кількість, достатню для надання сприятливого ефекту на організм пацієнта. Такий сприятливий ефект може являти собою щонайменше полегшення принаймні одного симптому. Кількість, яка вводиться в дійсності, та швидкість і тимчасова схема введення буде залежати від природи та тяжкості стану, що піддається лікуванню. Приписання лікування, наприклад, визначення дози, знаходиться в рамках компетенції лікарів загальної практики та інших лікарів.

Сполука згідно з даним винаходом може вводитися окремо або в комбінації з іншими схемами лікування, одночасно або послідовно, в залежності від стану, що піддається лікуванню. Приклади схем лікування й терапій включають, але не обмежуються ними, хіміотерапію (введення активних агентів, включаючи, наприклад, лікарські засоби, такі як хіміотерапевтичні агенти); хірургію та променеви терапію.

"Хіміотерапевтичний агент" являє собою хімічну сполуку, яка застосовується для лікування раку, незалежно від механізму дії. Класи хіміотерапевтичних агентів включають, але не обмежуються ними: алкілюючі агенти, антиметаболіти, рослинні алкалоїди, які блокують мітотичне веретено, цитотоксичні/протипухлинні антибіотики, інгібітори топоізомерази, антитіла, фотосенсибілізатори та інгібітори кіназ. Хіміотерапевтичні агенти включають сполуки, які використовуються в "спрямованій терапії" та традиційній хіміотерапії.

Приклади хіміотерапевтичних агентів включають: ерлотиніб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS No. 51-21-8), гемцитабін (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-діамін дихлорплатину (II), CAS No. 15663-27-1), карбоплатин (CAS No. 41575-94-4), паклітаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерсі), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломід CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенілбут-1-еніл)фенокси]-N, N-диметилетанамін, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) та доксорубіцин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD та рапаміцин.

Додаткові приклади хіміотерапевтичних агентів включають: оксаліплатин (ELOKCATIN®, Sanofi), бортезоміб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), іматиніб мезилат (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (інгібітор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (інгібітор Mek, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (інгібітор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (інгібітор PI3K, Novartis), XL-147 (інгібітор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолінова кислота), рапаміцин (сиролімус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиніб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарніб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафеніб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), рефітиніб (IRESSA®, AstraZeneca), іринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), тіпіфарніб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофора), лікарські форми паклітакселу у вигляді пов'язаних із альбуміном наночастинок (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаніб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролімус (TORISEL®, Wyeth), пазопаніб (GlaxoSmithKline), канфосфамід (TELCYTA®, Telik), тіотепа і циклофосфамід (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкілсульфонати, такі як бусульфат, імпросульфат і піпосульфат; азиридины, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленімін і метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметиломеламін; ацетогеніни (зокрема булатацин і булацінон); камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезін, карзелезін і бізелезін); криптофіцини (зокрема криптофіцин 1 та криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеотеробін; панкратистатин; саркодіктин; спонгістатин; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретамін оксид гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, феностерін, преднімустин, трофосфамід, урамустин; нітрозосечовина, така як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як ендіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, каліхеаміцин гамма I1, каліхеаміцин омега I1 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); дінеміцин, дінеміцин А; бісфосфонати, такі як клодронат; еспераміцин; а також

неокарциностатиновий хромофор і родинні хромпротеїнові енедіїнові хромофорні антибіотики), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцин, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, неморубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, порфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; анти-метаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мерітіостан, тестолактон; антитіла до гормонів надниркових залоз, такі як аміноглутетимід, мітотан, трілостан; замісники фолієвої кислоти, такі як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід глікозид; амінолевуленова кислота; енілурацил; амсакрін; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазихон; елфорнітин; еліптинію ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїнин; маїтанзиноїди, такі як маїтанзин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон, США); разоксан; різоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонова кислота; триазилахон; 2,2",2"-трихлортриетиламін; трихотецени (зокрема, Т-2 токсин, верацури А, рорідин А та ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ага-С"); циклофосфамід; тіотепа; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; платинові аналоги, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрестин; вінорелбін (NAVELBINE®); новантрон; теніпозид; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; капецитабін (XELODA®, Roche); ібандронат; СРТ-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноєва кислота; та фармацевтично прийнятні солі, кислоти та похідні будь-яких із зазначених вище сполук.

Визначення "хіміотерапевтичний агент" також включає: (i) анти-гормональні агенти, які регулюють або інгібують дію гормонів на пухлини, такі як анти-естрогени й селективні модулятори рецептора естрогенів (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи NOLVADEX®; тамоксифен цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, тріоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон та FARESTON® (тореміфін цитрат); (ii) інгібітори ароматази, які інгібують фермент-ароматазу, який регулює продукцію естрогенів у надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, MEGASE® (мегестрол ацетат), AROMASIN® (екземестан; Pfizer), форместан, фадрозол, RIVISOR® (ворозол, FEMARA® (летрозол; Novartis) та ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) анти-андрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і госерелін; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог цитозинового нуклеозиду); (iv) інгібітори протеїнкінази, такі як інгібітори MEK (WO 2007/044515); (v) інгібітори ліпідкіназ; (vi) антисмислові олігонуклеотиди, зокрема олігонуклеотиди, які пригнічують експресію генів у сигнальних шляхах, залучених до порушеної проліферації клітин, наприклад, PKC-альфа, Raf та H-Ras, такі як облімерсен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозими, такі як інгібітори експресії VEGF (наприклад, ANGIOZYME®) та інгібітори експресії HER2; (viii) вакцини, такі як генотерапевтичні вакцини, наприклад, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; інгібітори топоізомерази 1, такі як LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангіогенні агенти, такі як бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти та похідні будь-яких із вищевказаних сполук.

Визначення "хіміотерапевтичний агент" також включає терапевтичні антитіла, такі як алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панітумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумумаб (Bexxar, Corixa), та кон'югат антитіло-лікарський засіб гемтузумаб озогаміцин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманізовані моноклональні антитіла, які мають терапевтичний потенціал для застосування як хіміотерапевтичні агенти в комбінації з кон'югатами згідно з даним винаходом, включають: алемтузумаб, аполізумаб, азелізумаб, атлізумаб, бапінейзумаб, бевацизумаб, біватузумаб, мертанзин, кантузумаб мертанзин, цеделізумаб, цетролізумаб пегол, цидфузитузумаб,

цидтузумаб, даклізумаб, екулізумаб, ефалізумаб, епратузумаб, ерлізумаб, фелвізумаб, фонотолізумаб, гемтузумаб озогаміцин, інотузумаб озогаміцин, іпілімумаб, лабетузумаб, лінтузумаб, матузумаб, меполізумаб, мотавізумаб, мотовізумаб, наталізумаб, німотузумаб, ноловізумаб, нумавізумаб, окрелізумаб, омалізумаб, палівізумаб, пасколізумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселізумаб, ралівізумаб, ранібізумаб, реслівізумаб, реслізумаб, ресівізумаб, ровелізумаб, руплізумаб, сібротузумаб, сіплізумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, талізумаб, тефібазумаб, тоцилізумаб, торалізумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкін, тукуситузумаб, умавізумаб, уртоксазумаб та візилізумаб.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом та для застосування відповідно до даного винаходу можуть містити крім активного інгредієнту, тобто сполуки, яка являє собою кон'югат, фармацевтично прийнятний наповнювач, носій, буфер, стабілізатор або інші речовини, добре відомі фахівцям у даній області техніки. Зазначені речовини повинні бути нетоксичними і не повинні впливати на ефективність активного інгредієнта. Конкретна природа носія або іншої речовини залежить від способу введення, який може бути пероральним або ін'єкційним, наприклад, шкірною, підшкірною або внутрішньовенною ін'єкцією.

Фармацевтичні композиції для перорального введення можуть бути представлені в формі таблетки, капсули, порошку або рідини. Таблетка може містити твердий носій або допоміжну речовину. Рідкі фармацевтичні композиції зазвичай містять рідкий носій, такий як вода, вазелін, тваринні або рослинні олії, мінеральну олію або синтетичну олію. Може бути включений фізіологічний сольовий розчин, декстроза або розчин іншого сахариду, або гліколі, такі як етиленгліколь, пропіленгліколь або поліетиленгліколь. Капсула може містити твердий носій, такий як желатин.

Для внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції чи ін'єкції в місце ураження активний інгредієнт може перебувати в формі підходящого для парентерального введення водного розчину, який є апірогеним і має відповідне значення рН, є ізотонічним і стабільним. Фахівці в даній галузі техніки можуть отримати відповідні розчини з використанням, наприклад, ізотонічних розріджувачів, таких як розчин хлориду натрію для ін'єкцій, розчин Рінгера для ін'єкцій, лактований розчин Рінгера для ін'єкцій. При необхідності можуть бути включені консерванти, стабілізатори, буфери, антиоксиданти і/або інші добавки.

Лікарські форми

Незважаючи на те, що сполуку, яка являє собою кон'югат, можливо застосовувати (наприклад, вводити) окремо, часто є переважним застосовувати її у вигляді композиції або лікарської форми.

Згідно з одним варіантом реалізації композиція являє собою фармацевтичну композицію (наприклад, лікарську форму, препарат, лікарський засіб), яка містить сполуку, що являє собою кон'югат, описану в даній заявці, і фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

Згідно з одним варіантом реалізації композиція являє собою фармацевтичну композицію, яка містить щонайменше одну сполуку, що являє собою кон'югат, як описано в даній заявці, разом із одним або більше іншими фармацевтично прийнятними інгредієнтами, добре відомими фахівцям у даній області техніки, включаючи, але не обмежуючись ними, фармацевтично прийнятні носії, розріджувачі, наповнювачі, допоміжні речовини, основи, буфери, консерванти, антиоксиданти, змащуючі речовини, стабілізатори, сольобілізатори, поверхнево-активні речовини (наприклад, змочувальні агенти), маскуючі агенти, барвники, ароматизатори та підсолоджувачі.

Згідно з одним варіантом реалізації композиція додатково містить інші активні агенти, наприклад, інші терапевтичні або профілактичні агенти.

Підходящі носії, розріджувачі, наповнювачі і т.д. можуть бути знайдені в стандартних фармацевтичних текстах. Див., наприклад, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (за ред. M. Ash та I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, вид. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000 і Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

Інший аспект даного винаходу відноситься до способів одержання фармацевтичної композиції, які включають змішування щонайменше одного [¹¹C]-радіоактивно міченого кон'югату або подібного кон'югату сполуки, як визначено в даній заявці, разом із одним або більше іншими фармацевтично прийнятними інгредієнтами, добре відомими фахівцям у даній області техніки, наприклад, носіями, розріджувачами, наповнювачами і т.д. Якщо зазначена композиція представлена у вигляді дискретних одиниць (наприклад, таблеток і т.д.), кожна зазначена одиниця містить попередньо визначену кількість (дозу) активної сполуки.

У даному описі термін "фармацевтично прийнятний" належить до сполук, інгредієнтів, матеріалів, композицій, дозованих лікарських форм і т.д., які за результатами ретельної медичної перевірки є придатними для застосування в контакт з тканинами суб'єкта (наприклад, людини), що представляє інтерес, і не проявляють надмірної токсичності, не викликають подразнення, алергічні реакції або інші проблеми чи ускладнення відповідно до розумного відношення користь/ризик. Кожен носій, розріджувач, наповнювач і т.д. також повинен бути "прийнятним" з точки зору сумісності з іншими інгредієнтами лікарської форми.

Лікарські форми можуть бути отримані за допомогою способів, добре відомих у галузі фармації. Зазначені способи включають етап приведення у взаємодію активної сполуки з носієм, який включає один або більше додаткових інгредієнтів. У цілому, лікарські форми одержують шляхом рівномірного і ретельного приведення у взаємодію активної сполуки з носіями (наприклад, рідкими носіями, дрібнодисперсним твердим носієм і т.д.), а потім, за необхідності, надання форми продукту.

Лікарська форма може бути приготована в формі зі швидким або повільним вивільненням; негайним, відстроченим, регульованим або уповільненим вивільненням; або з їх комбінацією.

Лікарські форми, придатні для парентерального введення (наприклад, шляхом ін'єкції), включають водні або неводні, ізотонічні, апірогенні, стерильні рідини (наприклад, розчини, суспензії), у яких активний інгредієнт розчинений, суспендований або включений іншим чином (наприклад, у ліпосомі або іншій мікрочастинці). Зазначені рідини можуть додатково містити інші фармацевтично прийнятні інгредієнти, такі як антиоксиданти, буфери, консерванти, стабілізатори, бактеріостатики, суспендуючі агенти, загусники і розчини, які роблять лікарську форму ізотонічної крові (або іншої відповідної рідини тіла) передбачуваного реципієнта. Приклади наповнювачів включають, наприклад, воду, спирти, поліоли, гліцерин, рослинні олії і т.п. Приклади відповідних ізотонічних носіїв для застосування у зазначених лікарських формах включають розчин хлориду натрію для ін'єкцій, розчин Рінгера або лактований розчин Рінгера для ін'єкцій. Як правило, концентрація активного інгредієнта в рідині становить від приблизно 1 нг/мл до приблизно 10 мкг/мл, наприклад, від приблизно 10 нг/мл до приблизно 1 мкг/мл. Лікарські форми можуть бути представлені в одnodозових або багатордозових герметичних контейнерах, наприклад, ампулах та флаконах, і можуть зберігатися у вигляді висушеного сублімацією (ліофілізованого) продукту, до якого необхідно лише додати стерильний рідкий носій, наприклад, воду для ін'єкцій, безпосередньо перед застосуванням. Розчини та суспензії для негайного застосування можуть бути приготовлені зі стерильних порошків, гранул і таблеток.

Дозування

Фахівцям у даній області техніки очевидно, що відповідні дози сполуки, яка являє собою кон'югат, і композицій, що містять сполуку, яка являє собою кон'югат, можуть варіюватися залежно від конкретного пацієнта. Визначення оптимальної дози в цілому включає зважування відношення терапевтичної користі та ризику або небезпечних побічних ефектів. Обрана доза залежить від різних факторів, включаючи, але не обмежуючись ними, активність певної сполуки, спосіб введення, час введення, швидкість виведення сполуки, тривалість лікування, інші лікарські засоби, сполуки і/або речовини, які використовуються в комбінації, тяжкість стану й вид, стать, вік, маса тіла, стан, загальний стан здоров'я та історія хвороби пацієнта. Кількість сполуки і спосіб введення в кінцевому підсумку визначається лікарем, ветеринаром або клініцистом, незважаючи на те, що зазвичай доза вибирається з метою досягнення таких локальних концентрацій у місці прикладання дії, які забезпечують досягнення бажаного ефекту без суттєвих несприятливих або небезпечних побічних ефектів.

Можна здійснювати безперервне або переривчасте (наприклад, у дрібних дозах із відповідними інтервалами) введення одноразової дози протягом курсу лікування. Способи визначення найбільш ефективних способів і дози введення добре відомі фахівцям в даній області техніки й варіюються в залежності від використовуваної в терапії лікарської форми, мети терапії, клітини-мішені (клітин-мішеней), що піддається лікуванню, і суб'єкта, який піддається лікуванню. Можна здійснювати одноразове чи багаторазове введення, при цьому дози і схема введення вибираються лікарем, ветеринаром або клініцистом.

У цілому, підходяща доза активної сполуки знаходиться в діапазоні від приблизно 100 нг до приблизно 25 мг (як правило, від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мг) на кілограм маси тіла суб'єкта на добу. Якщо активна сполука являє собою сіль, складний ефір, амід, проліки або т.п., кількість, що вводиться, розраховують на основі початкової сполуки, тому фактична маса пропорційно збільшується.

Згідно з одним варіантом реалізації активну сполуку вводять пацієнту, який являє собою людину, відповідно до наступної схеми дозування: приблизно 100 мг, 3 рази на добу.

Згідно з одним варіантом реалізації активну сполуку вводять пацієнту, який являє собою людину, відповідно до наступної схеми дозування: приблизно 150 мг, 2 рази на добу.

Згідно з одним варіантом реалізації активну сполуку вводять пацієнту, який являє собою людину, відповідно до наступної схеми дозування: приблизно 200 мг, 2 рази на добу.

5 Однак, згідно з одним варіантом реалізації сполуку, яка являє собою кон'югат, вводять пацієнту, який являє собою людину, відповідно до наступної схеми дозування: приблизно 50 або приблизно 75 мг, 3 або 4 рази на добу.

Згідно з одним варіантом реалізації сполуку, яка являє собою кон'югат, вводять пацієнту, який являє собою людину, відповідно до наступної схеми дозування: приблизно 100 або 10 приблизно 125 мг, 2 рази на добу.

Розмір дози, описаний вище, може відноситися до кон'югату (включаючи кон'югат PBD фрагмента і лінкера з антитілом) або до ефективної кількості запропонованої PBD сполуки, наприклад, кількості сполуки, яка може вивільнятися після відщеплення лінкера.

Відповідне дозування ADC згідно з даним винаходом для профілактики або лікування 15 захворювання залежить від типу захворювання, що піддається лікуванню, як визначено вище, тяжкості та перебігу захворювання, введення молекули з метою профілактики або терапії, попереднього терапевтичного лікування, історії хвороби пацієнта і відповіді на антитіло та рішення лікаря, що проводить лікування. Молекула підходящим чином вводиться пацієнту 20 одноразово або протягом декількох етапів лікування. Залежно від типу та тяжкості захворювання від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1-20 мг/кг) молекули є початковою передбачуваною дозою для введення пацієнтові, наприклад, шляхом одного або більше окремих введень або шляхом безперервної інфузії. Зазвичай добова доза може 25 варіюватися від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, в залежності від факторів, перерахованих вище. Приклад дози ADC для введення пацієнтові знаходиться в діапазоні від приблизно 0,1 до приблизно 10 мг/кг маси тіла пацієнта. У разі повторних введень протягом 25 декількох днів або більше, залежно від стану, лікування підтримується до досягнення бажаного придушення симптомів захворювання. Приклад схеми дозування включає курс введення початкової навантажувальної дози, яка становить приблизно 4 мг/кг, з наступним введенням 30 додаткових доз ADC кожен тиждень, два тижні чи три тижні. Можна застосовувати інші схеми дозування. Зміни ефекту зазначеної терапії легко спостерігати за допомогою традиційних методів і випробувань.

Лікування

У даному описі термін "лікування" в контексті лікування стану в цілому відноситься до лікування і терапії людини або тварини (наприклад, при застосуванні у ветеринарній медицині), 35 при якому досягається деякий бажаний терапевтичний ефект, наприклад, придушення прогресування зазначеного стану, та включає зниження швидкості прогресування, припинення прогресування, регресію стану, полегшення стану та виліковування стану. Термін також включає лікування як профілактичний захід (тобто профілактика, попередження).

У даному описі термін "терапевтично ефективна кількість" відноситься до такої кількості 40 активної сполуки або речовини, композиції або дозованої форми, яка містить активну сполуку, що є ефективною для досягнення деякого бажаного терапевтичного ефекту, співмірного з розумним відношенням користь/ризик, при введенні відповідно до бажаної схеми лікування.

Аналогічно, в даному описі термін "профілактично ефективна кількість" відноситься до такої 45 кількості активної сполуки або речовини, композиції або дозованої форми, яка містить активну сполуку, що є ефективною для досягнення деякого бажаного профілактичного ефекту співмірного з розумним відношенням користь/ризик, при введенні відповідно до бажаної схеми лікування.

Отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб

Кон'югати антитіло-лікарський засіб можуть бути отримані декількома способами з 50 використанням реакцій органічного синтезу, умов та реагентів, відомих фахівцям у даній області техніки, які включають: (1) взаємодію нуклеофільної групи або електрофільної групи антитіла з бівалентним лінкерним реагентом з утворенням шляхом ковалентного зв'язку інтермедіату антитіло-лінкер Ab-L з наступною реакцією отриманого інтермедіату з активованим фрагментом лікарського засобу; та (2) взаємодію фрагменту лікарського засобу з лінкерним реагентом з 55 утворенням шляхом ковалентного зв'язку реагента лікарський засіб-лінкер DL з подальшою його взаємодією з нуклеофільною групою або електрофільною групою антитіла. Для отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб згідно з даним винаходом в способах кон'югації (1) та (2) можна використовувати різні антитіла та лінкери.

Нуклеофільні групи антитіл включають, але не обмежуються ними: (i) N-кінцеві аміногрупи, 60 (ii) аміногрупи бічних ланцюгів, наприклад, лізину, (iii) тіолові групи бічних ланцюгів, наприклад,

цистеїну, та (iv) гідроксильні групи або аміногрупи цукрів, де антитіло є глікозильованим. Аміно, тіолові та гідроксильні групи є нуклеофільними і здатні взаємодіяти з утворенням ковалентних зв'язків із електрофільними групами лінкерних фрагментів та лінкерних реагентів, які включають: (i) активні складноефірні групи таких сполук, як складні ефіри NHS, складні ефіри HOBT, галогенформіати та галогенангідриди; (ii) алкіл- та бензилгалогенідні, такі як галогенацетамідні; (iii) альдегідні, кетони, карбоксильні та малеїмідні групи. Певні антитіла містять відновлювані міжланцюгові дисульфідні групи, тобто цистеїнові мостики. Для кон'югації з лінкерними реагентами антитіла можна активувати шляхом обробки відновлювачем, таким як ДТТ (реагент Клеланда, дитіотреїтол) або TCEP (гідрохлорид трис(2-карбоксиетил)фосфіну; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Беверлі, Массачусетс). Теоретично, в результаті вказаної обробки кожен цистеїновий дисульфідний мостик утворює дві реакційноздатні тіолові нуклеофільні групи. Додаткові нуклеофільні групи можна вводити до антитіл при взаємодії лізину із 2-імінотіолоном (реагентом Траута), що призводить до перетворення аміногрупи в тіолову.

Кон'югат антитіло-лікарський засіб також можна отримати за рахунок модифікації антитіла з введенням електрофільних фрагментів, які можуть взаємодіяти з нуклеофільними замісниками лінкерного реагента. Цукрові групи глікозильованих антитіл можна піддати окислюванню, наприклад, періодатними окислювачами, з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть реагувати з аміногрупою лінкерних реагентів або лікарських фрагментів. Отримані імінні групи основи Шиффа можуть утворити стабільний зв'язок або можуть відновлюватися, наприклад, за допомогою боргідридних реагентів, з утворенням стабільних амінних зв'язків. Згідно з одним варіантом реалізації взаємодія вуглеводневого фрагменту глікозильованого антитіла з галактозоксидазою або з мета-періодатом натрію може призводити до утворення карбонільних (альдегідних та кетонних) груп у білку, які можуть реагувати з відповідними групами лікарського засобу (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242). Згідно з іншим варіантом реалізації білки, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть реагувати з мета-періодатом натрію з утворенням замість першого амінокислотного залишку альдегідної групи (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Зазначена альдегідна група може взаємодіяти з фрагментом лікарського засобу або нуклеофільним лінкером.

Аналогічно, нуклеофільні групи фрагмента лікарського засобу включають, але не обмежуються ними: аміногрупи, тіолові, гідроксильні, гідразидні, оксимні, гідразинові, тіосемікарбазонові, гідразинкарбоксилатні та арилгідразидні групи, здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків із електрофільними групами лінкерних фрагментів та лінкерних реагентів, які включають: (i) активні складноефірні групи таких сполук як складні ефіри NHS, складні ефіри HOBT, галогенформіати та галогенангідриди; (ii) алкіл-та бензилгалогенідні, такі як галогенацетамідні; (iii) альдегідні, кетони, карбоксильні та малеїмідні групи. Реакційноздатні нуклеофільні групи можна вводити до сполук, які є похідними антрацикліну, за допомогою стандартних взаємоперетворень функціональних груп. Наприклад, гідроксильні групи можна переводити в тіолові групи за допомогою реакцій Міцунобу з утворенням тіол-модифікованої лікарської сполуки.

Суб'єкт / пацієнт

Суб'єкт/пацієнт може являти собою тварину, ссавця, плацентарного ссавця, сумчастого (наприклад, кенгуру, вомбат), однопрохідного (наприклад, качконіс), гризуна (наприклад, морська свинка, хом'як, пацюк, миша), мишачих (наприклад, миша), зайцеподібних (наприклад, кролик), птахів (наприклад, птах), псових (наприклад, собака), котячих (наприклад, кішка), кінських (наприклад, кінь), свиней (наприклад, свиня), вівцевих (наприклад, вівця), бичачих (наприклад, корова), примата, мавпу (наприклад, мавпа або мартишка), мартишку (наприклад, ігрунка, павіан), людиноподібну мавпу (наприклад, горіла, шимпанзе, орангутанг, гібон) або людину.

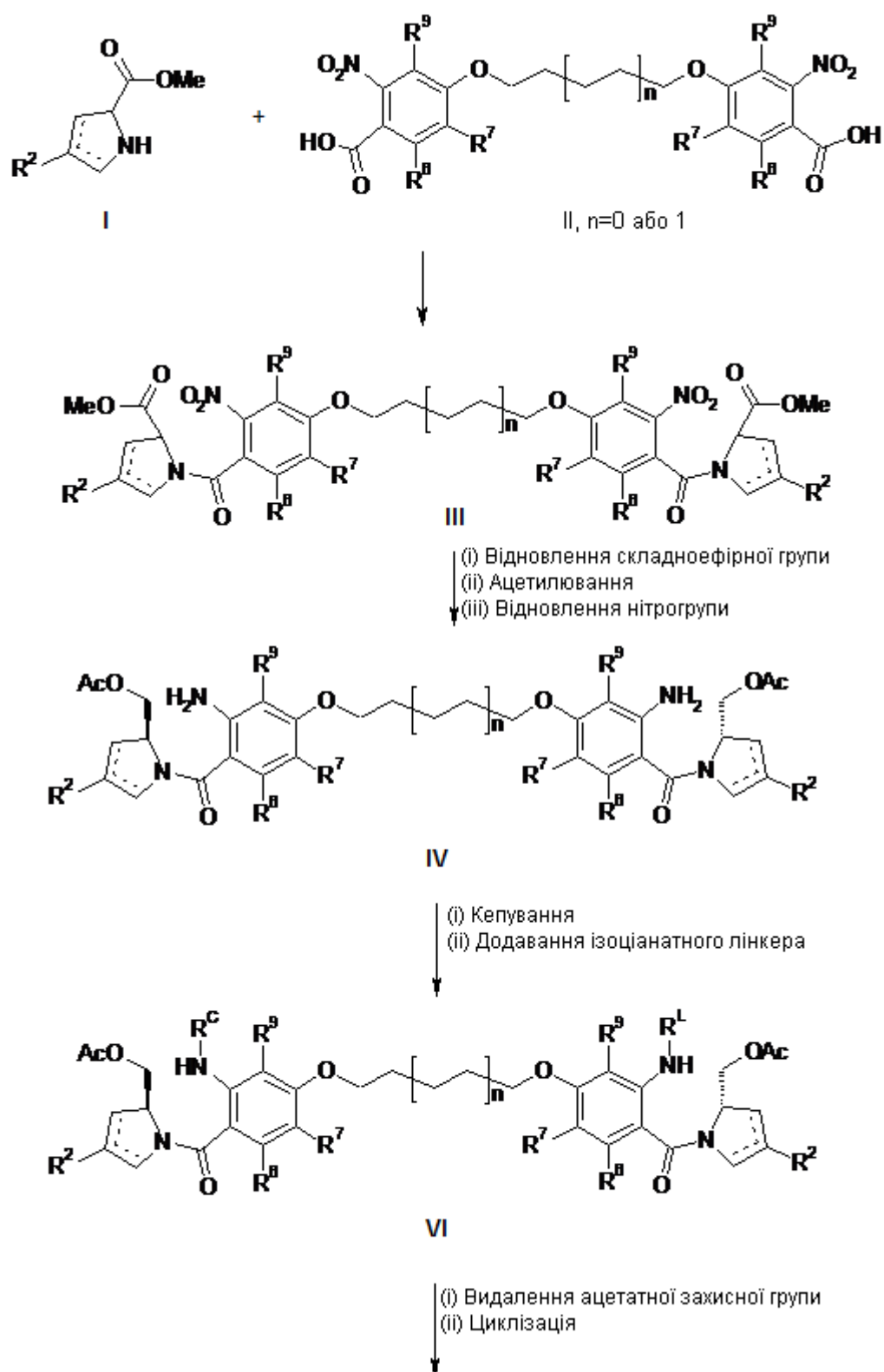
Більше того, суб'єкт/пацієнт може перебувати на будь-якій стадії розвитку, наприклад, на стадії ембріона. Згідно з одним переважним варіантом реалізації суб'єкт/пацієнт являє собою людину.

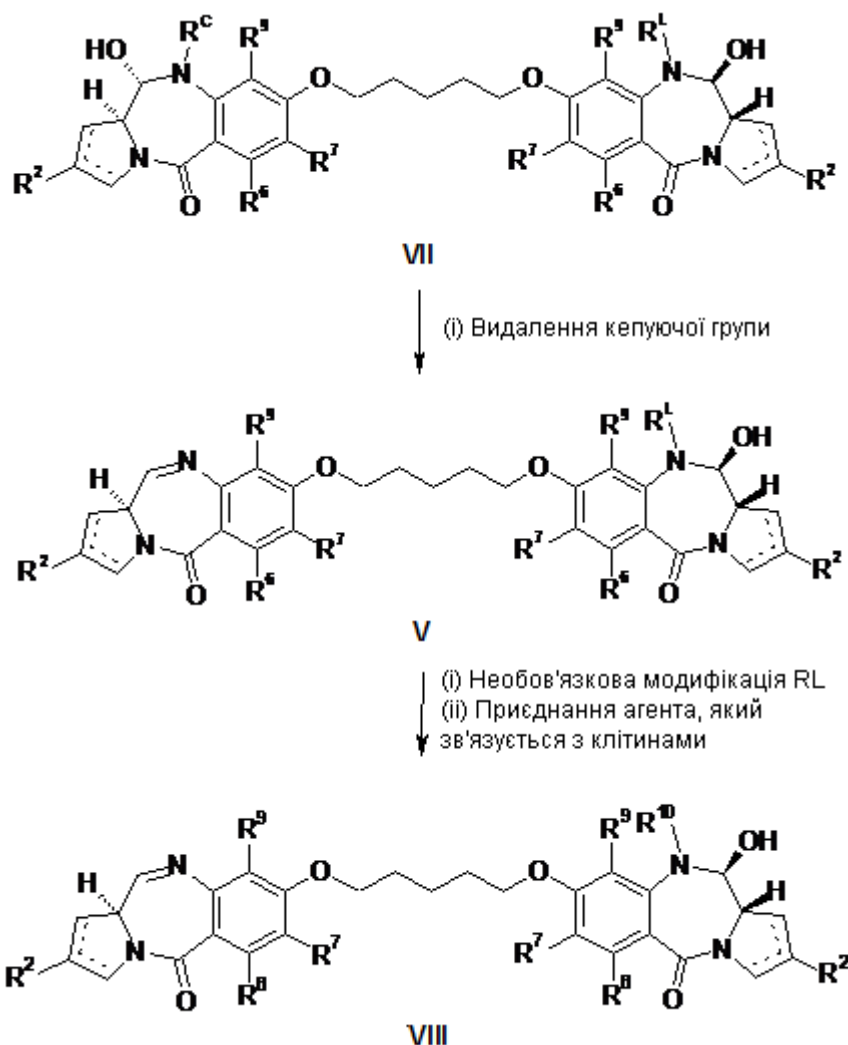
Згідно з одним варіантом реалізації пацієнти являють собою популяцію, в якій кожен пацієнт страждає від пухлини, на поверхні клітин якої знаходиться $\alpha_v\beta_6$.

Синтез

Згідно з одним варіантом реалізації димерний кон'югат формули VIII можна отримати зі сполук I та II, як показано на Схемі 1.

Схема 1





У цілому, несиметричні димери можна отримати обробкою біс-аміносполуки формули IV одним еквівалентом комерційно доступного (або такого, що легко синтезується) хлороформіатного реагента для порушення симетрії молекули. Вільна аміногрупа, яка залишилася, потім може бути незалежно функціоналізованою для введення необхідної терапевтично лабільної прогрупи (R^L). Додаткові реакції функціональної групи з замиканням В-кільця РВД, видаленням захисних та кепуючих груп і введенням функціональної групи, яка зв'язується з антитілом, наприклад G^1 , призводять до отримання бажаної молекули.

Сполуки формули IV, як правило, отримують реакцією поєднання підходящим чином функціоналізованого фрагмента (I) С-кільця з димерним ядром формули II, яке містить А-кільце. Фрагменти С-кільця можна отримати з відомих структурних елементів метил-4-оксопролінату, які містять карбаматну захисну групу. Олефінування в умовах реакції Віттіга або Хорнера-Еммонса можна використовувати для отримання ендо- або екзо-ненасичених алкенів. Альтернативно, послідовне трифлатування і реакції поєднання Сузукі можна використовувати для отримання 4-арил-заміщених 3,4 - або 4,5-ненасичених фрагментів С-кільця. Поєднання фрагментів С-кільця та А-кільця можна проводити в стандартних умовах у присутності триетиламіну з використанням хлорангідридних похідних фрагментів А-кільця з утворенням молекули формули III. Сполуки типу III можна відновити обробкою цинком у оцтовій кислоті із збереженням ендогенної або екзогенної ненасиченості С-кільця з отриманням молекули формули IV.

Несиметричні карбамати типу VI можна отримати обробкою біс-амінів типу IV одним еквівалентом комерційно доступних (або таких, що легко синтезуються) хлороформіатів у присутності піридину або триетиламіну. Хлороформіати можуть бути вибрані таким чином, щоб отримати кепуючі карбаматні групи (R^C), які розташовані ортогонально або в тій же площині, що і групи в прогрупі (R^L). Використання однакових карбаматів дає можливість одночасного видалення обох захисних груп, що скорочує кількість етапів синтезу. Однак, видалення кепуючих карбаматних груп (R^C) потребує додавання функціональної групи, яка зв'язується з

антитілом, в присутності лабільного N10-C11 імінного або карбіноламінного фрагменту. За необхідності, зазначену операцію можна виключити шляхом застосування ортогональних карбаматних захисних груп, що забезпечує приєднання фрагментів, які зв'язуються з антитілом, при збереженні захисту N10-C11 карбіноламінного фрагмента. При такому підході зняття захисту фрагмента N10-C11 необхідно проводити в присутності фрагмента, який зв'язується з антитілом, а реагенти, що використовуються, повинні бути сумісними зі вказаним фрагментом. Наприклад, якщо зняття захисту N10-C11 імінної групи необхідно проводити в присутності малеїмідної групи, Tpos і Teos будуть придатними R^C групами, оскільки агенти для зняття захисту, комплекс Cd/Pb і TBAF, не повинні зачіпати малеїмідну групу. З іншого боку, необхідно уникати групи Allos, оскільки π-алільні скавенджери, такі як піролідін, можуть приєднуватися до положення 1, 4 малеїмідної групи. R^L-карбаматну групу можна ввести шляхом перетворення аміногрупи, що залишилася, в ізоціанатну та її гасіння R^L-спиртом. Альтернативно, R^L-спиртову групу можна перевести в хлороформіатну або еквівалентну функціональну групу (фторформіатну, п-нітрокарбонатну, пентафторкарбонатну або гідроксibenзотриазолкарбонатну). У кінцевому підсумку аміногрупа, що залишилася, може бути перетворена в реакційноздатну п-нітрокарбаматну, пентафторкарбаматну або гідроксibenзотриазолкарбаматну групу, яка може бути заміщена R^L-спиртовою групою з утворенням молекули формули VI.

Сполуки формули VII можна отримати зі сполуки формули VI шляхом видалення ацетатних захисних груп за допомогою карбонату калію у водному розчині метанолу або, у випадку присутності групи Fmoc у R^L, за допомогою триетилборгидриду літію. Окислення за допомогою періодату Деса-Мартіна (або, альтернативно, TPAP/NMO, PDC або в умовах реакції Скверна) призводить до отримання продукту із замкнутим кільцем.

Кон'югати формули V можна отримати зі сполук формули VII шляхом видалення кепуючої групи R^C, модифікацією введення в R^L фрагмента, який зв'язується з антитілом (наприклад, малеїмідокапроїльної групи), яку можна кон'югувати з агентом, який зв'язується з клітинами, таким як антитіло, в стандартних умовах (див. Dubowchik et al. Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869). Модифікація R^L може включати етап видовження групи за рахунок приєднання до неї елемента, який містить спейсер, такого як група G¹, яку потім можна використовувати для зв'язування з агентом, який зв'язується з клітинами (з утворенням групи A).

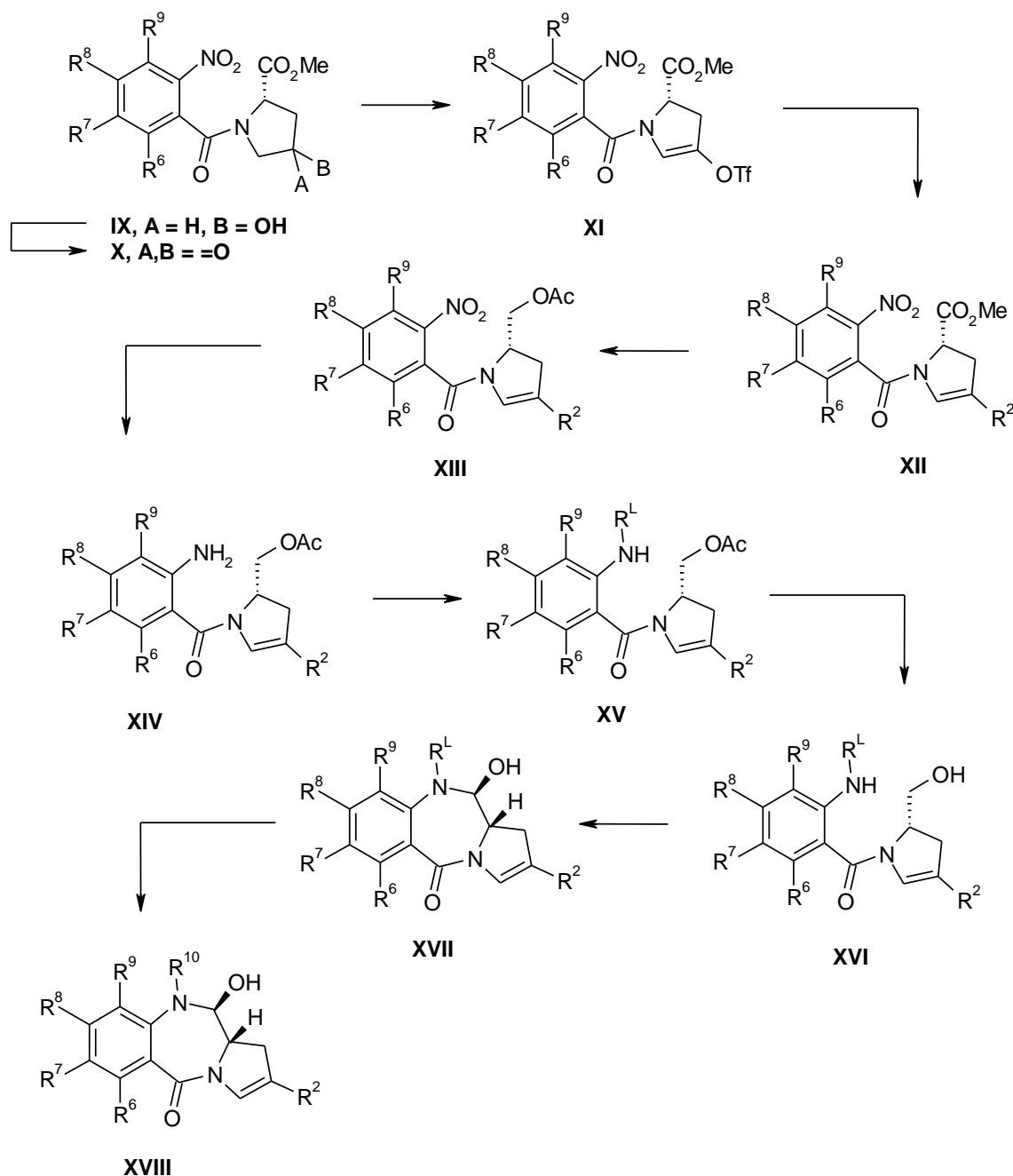
Мономерні сполуки та симетричні димери можна отримати аналогічним способом, як несиметричний димер, як описано вище.

Згідно з іншим варіантом реалізації кон'югат формули XVIII можна отримати зі сполуки IX, як показано на Схемі 2.

Сполука II

Синтез сполук формули (II) описаний у більш ранній публікації міжнародної заявки заявника даного винаходу WO 2006/111759, а також описаний у джерелі Gregson et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174. Отримання сполуки (II), описане в зазначених джерелах, спеціально включене до даної заявки за допомогою посилання. Сполука (IIa) має три вуглецеві лінкери. Сполука (IIb) має п'ять вуглецевих лінкерів.

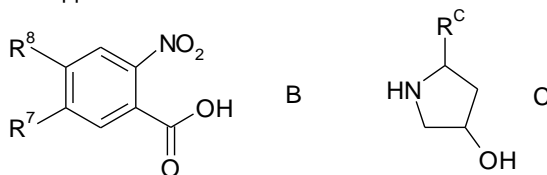
Схема 2



У наведеній схемі група R^2 являє собою C_{5-20} арильну групу. Сполуки формули IX описані у WO 2004/043963.

Сполуки формули X можна отримати зі сполук формули IX в результаті їх окислення, наприклад, із використанням: TCCA та TEMPO; BAIB та TEMPO; TPAP; у присутності реагента Деса-Мартіна або в умовах реакції Скверна.

Сполуки формули IX можна отримати в результаті поєднання відповідних сполук формул B та C або їхніх активованих похідних:



Сполуки формул B та C зазвичай комерційно доступні або є такими, що легко синтезуються. Якщо сполука B являє собою димер, то її можна отримати, як описано у WO 00/12508.

Сполуки формули XI можна отримати зі сполук формули X згідно зі способом, який включає обробку X відповідним ангідридом та безводним 2,6-лутидином або безводним 2,6-t-Bu-

піридином при температурі -35°C або нижче у безводному органічному розчиннику в інертній атмосфері. Сполука XI по суті не містить сполуки, яка містить C1-C2 подвійний зв'язок.

Необхідно зазначити, що отримання сполук, які містять C1-C2 подвійний зв'язок, описане в джерелі Kang et al., Chem. Commun., 2003, 1680-1689.

5 Сполуки формули XI можна переводити в сполуки формули XII. Зазначене перетворення (поєднання Сузукі) здійснюють за допомогою крос-поєднання сполуки XI в присутності паладієвого каталізатора з відповідною бор-вмісною арильною похідною. Паладієвий каталізатор може являти собою будь-який відповідний каталізатор, наприклад, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{OCOCH}_3)_2$, PdCl_2 $\text{Pd}(\text{dba})_3$.

10 Сполуки формули XII можна переводити в сполуки формули XIV через сполуку XIII. Зазначене перетворення здійснюють, спочатку відновлюючи складноефірну групу й повторно вводючи ацетатну захисну групу (або сілілефірну в альтернативному підході). Відновлення можна здійснювати стандартними способами, наприклад, за допомогою LiAlH_4 або NaBH_4 . Повторне введення ацетатної захисної групи можна здійснювати, наприклад, за допомогою реакції з ацетилхлориду (повторне введення сілілефірної захисної групи можна здійснювати, наприклад, реакцією з відповідним сілілхлоридом). Потім проводять відновлення нітрогрупи за допомогою, наприклад, цинку в оцтовій кислоті.

20 Сполуки формули XIV можна переводити в сполуки формули XV. Зазначене перетворення зазвичай досягається в результаті взаємодії сполуки XIV з трифосгеном з утворенням ізоціанату з наступною реакцією з $\text{R}^1\text{-OH}$. Зазначений підхід описаний у WO 2005/023814. Альтернативно, також можна вводити прості захисні групи атома азоту, такі як хлороформіат, фторформіат або азидоформіат. Можна вводити більш складні захисні групи атома азоту, а також прості захисні групи атома азоту, такі як О-сукцинамідкарбонати, О-пентафторфенілкарбонати й О-нітрофенілкарбонати.

25 Перетворення сполук XV в XVII можна проводити, видаляючи спочатку ацетатну захисну групу за допомогою карбонату калію у водному розчині метанолу або за допомогою триетилборгідриду літію. Окислення періодатом Деса-Мартіна (або, альтернативно, TPAP/NMO , TFAA/DMCO , SO_3 .піридиновий комплекс/ DMCO , PDC , PCC , BAIB/TEMPO або в умовах реакції Скверна) призводить до отримання продукту із замкнутим кільцем. Якщо замість ацетатної групи в сполуці присутня сілілефірна група, то перетворення XV в XVII можна здійснити, спочатку видаляючи сілілефірну захисну групу, наприклад, обробкою TBAF в ТГФ, оцтовою кислотою у водному ТГФ, CsF в ДМФА або HF в піридині, а потім проводячи окислення, як описано вище.

30 Потім проводили приєднання сполуки XVIII до агента, який зв'язується з клітинами. Послідовність етапу або етапів від XVII до XVIII залежить від природи R^1 . Вказану групу можна модифікувати, а потім приєднувати до агента, який зв'язується з клітинами, з утворенням кон'югату згідно з даним винаходом. Наприклад, захисну групу можна видаляти з отриманням функціональної групи, підходящої для реакції з агентом, який зв'язується з клітинами. На інших етапах зазначена функціональна група може зв'язуватися з додатковим спейсерним елементом, таким як група G^1 , і зазначений спейсерний елемент може, в свою чергу, бути потім з'єднаний із агентом, який зв'язується з клітинами (з утворенням групи А).

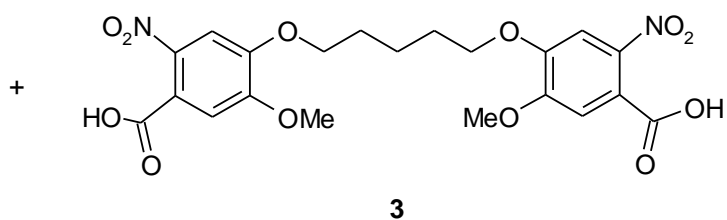
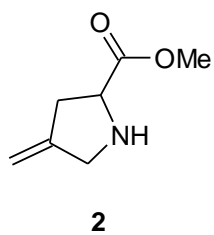
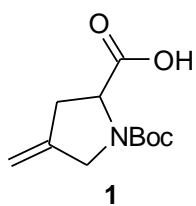
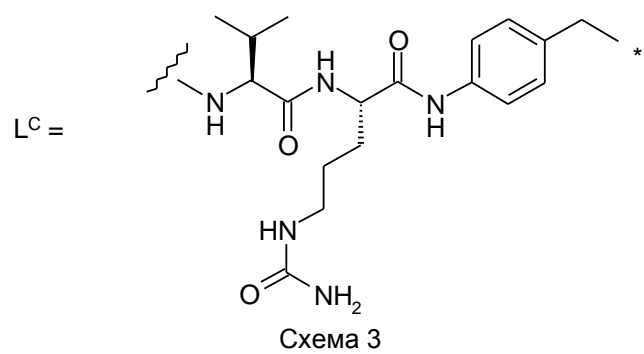
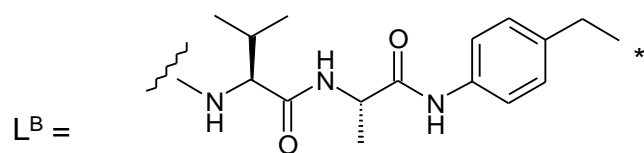
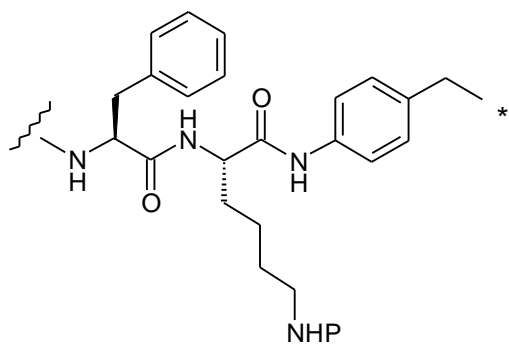
40 Згідно з деякими варіантами реалізації запропоновані сполуки формули AI, що включають сполуки формул AA і AB. Сполуки такого типу можна отримати з використанням способів, подібних до способів, описаних у WO 2010/091150. Проміжні сполуки, описані у WO 2010/091150, також можуть використовуватися в способах, описаних вище.

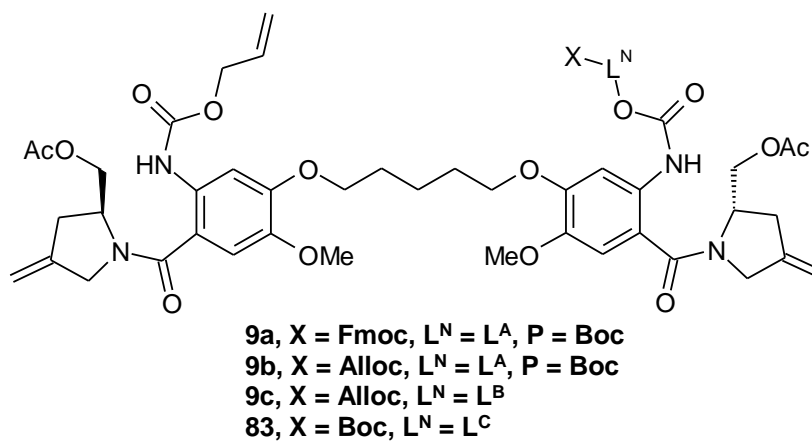
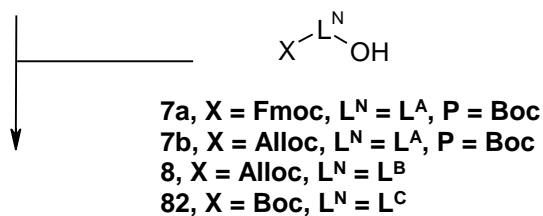
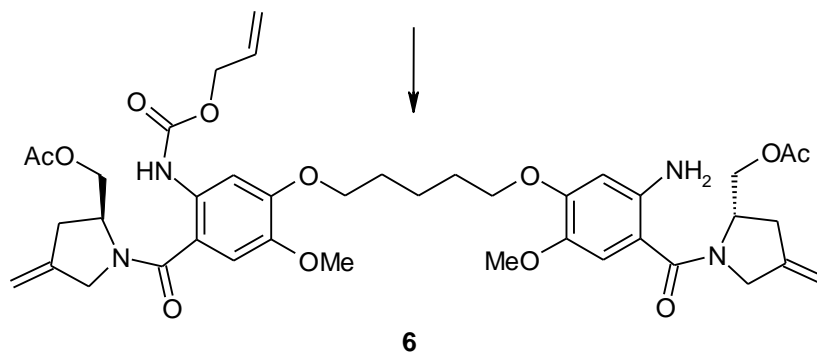
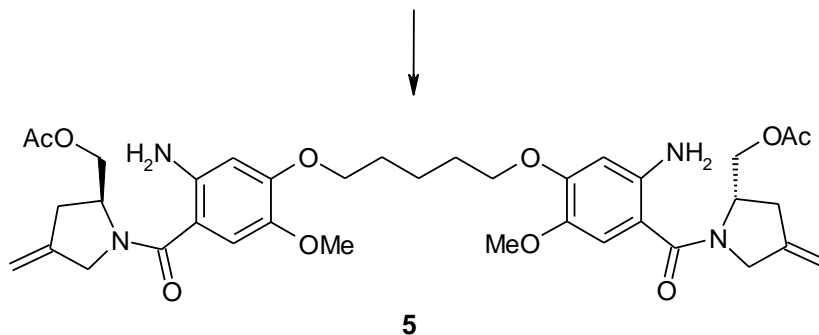
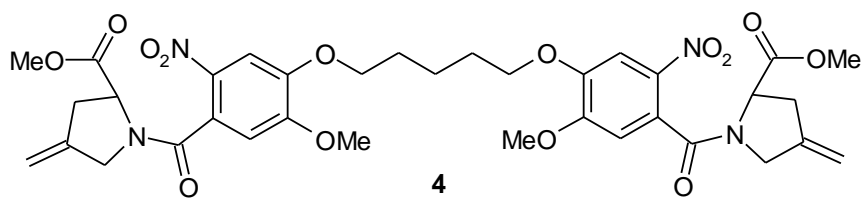
45 Наприклад, димерну сполуку (15), наведену у параграфі [164], можна використовувати як сполуку (III) в Схемі I, зазначеній вище. Мономерні сполуки зазначеного типу наведені як сполуки (3), (6) та (9). Описані вище та інші модифікації є очевидними для фахівців у даній області техніки.

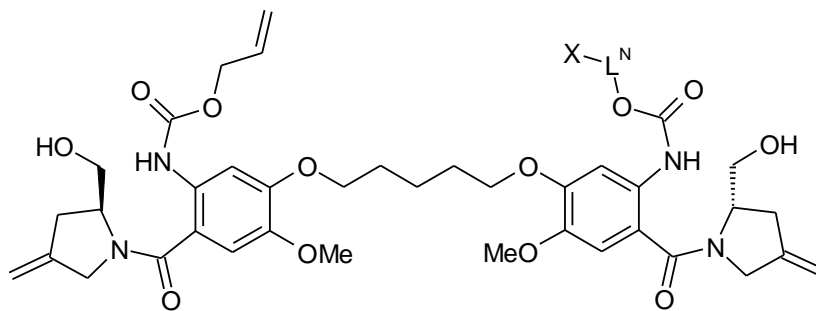
50 Переважні реакції синтезу

Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою сполуку 14, і зазначений кон'югат отримують, як показано на Схемі 3. Дипептиди 7a, b і 8 одержують, як описано в експериментальній частині, наведеній нижче. У зазначеній схемі лінкерні фрагменти L^1 та L^2 мають наступні структури:

55





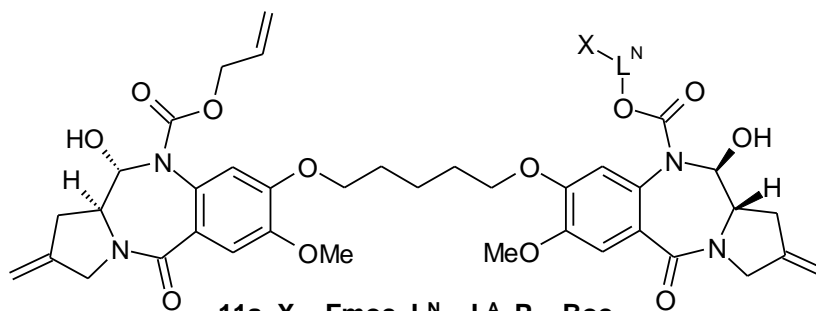


10a, X = Fmoc, L^N = L^A, P = Boc

10b, X = Alloc, $L^N = L^A$, P = Boc

10c, $X = \text{Alloc}$, $L^N = L^B$

84, X = Boc, L^N = L^C

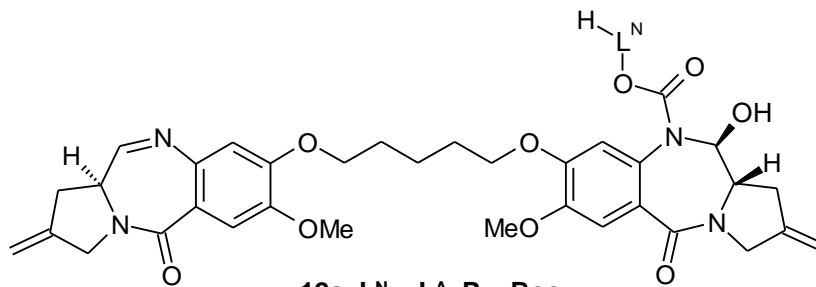


11a, X = Fmoc, L^N = L^A, P = Boc

11b, X = Alloc, L^N = L^A, P = Boc

11c, $X = \text{Alloc}$, $L^N = L^B$

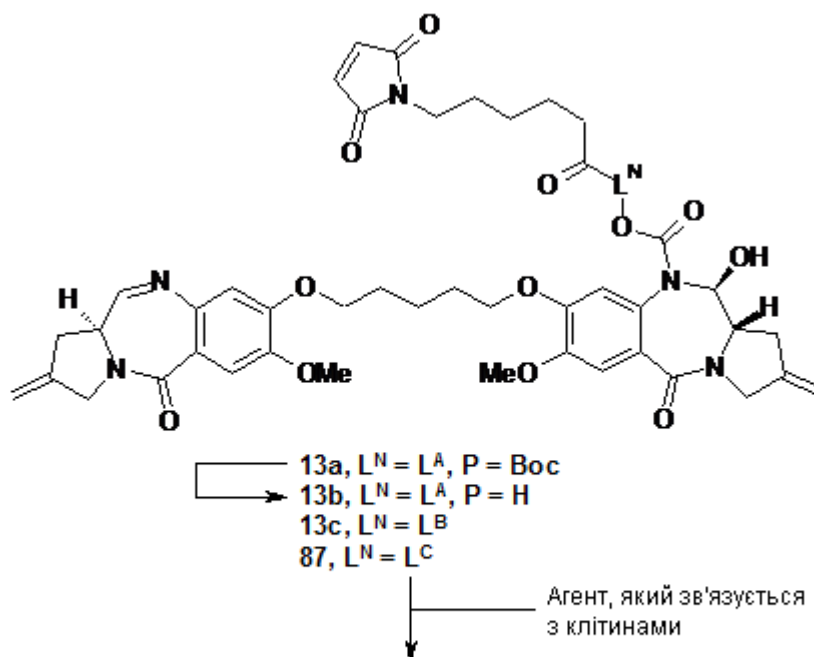
85, X = Boc, L^N = L^C



12a, L^N = L^A, P = Boc

12c, $L^N = L^B$

86, $L^N = L^C$



Сполука **14a**, $L^N = L^A$, $P = H$

Сполука **14c**, $L^N = L^B$

Сполука **88**, $L^N = L^C$

Сполуку 13с, де дипептид відповідає L^2 , можна отримати зі сполуки 12с відповідно до аналогічного способу.

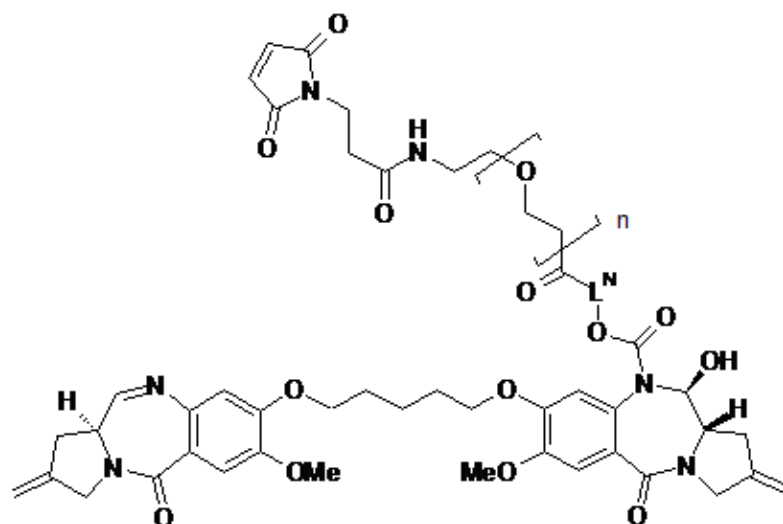
5 Згідно з одним варіантом реалізації кон'югат являє собою сполуку 16a або 16b, і зазначену сполуку одержують, як показано на Схемі 4, наведеній нижче, де сполуку 12a можна отримати, як описано вище:

Схема 4

12a, L^N = L^A, P = Boc

12c, $L^N = L^B$





- 15aa, $L^N = L^A$, $P = \text{Boc}$, $n = 4$
 15ba, $L^N = L^A$, $P = \text{H}$, $n = 4$
 15ab, $L^N = L^A$, $P = \text{Boc}$, $n = 8$
 15bb, $L^N = L^A$, $P = \text{H}$, $n = 8$
 15c, $L^N = L^B$, $n = 4$
 15d, $L^N = L^B$, $n = 8$
 15e, $L^N = L^B$, $n = 24$

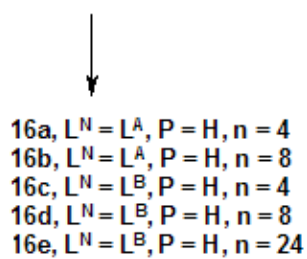
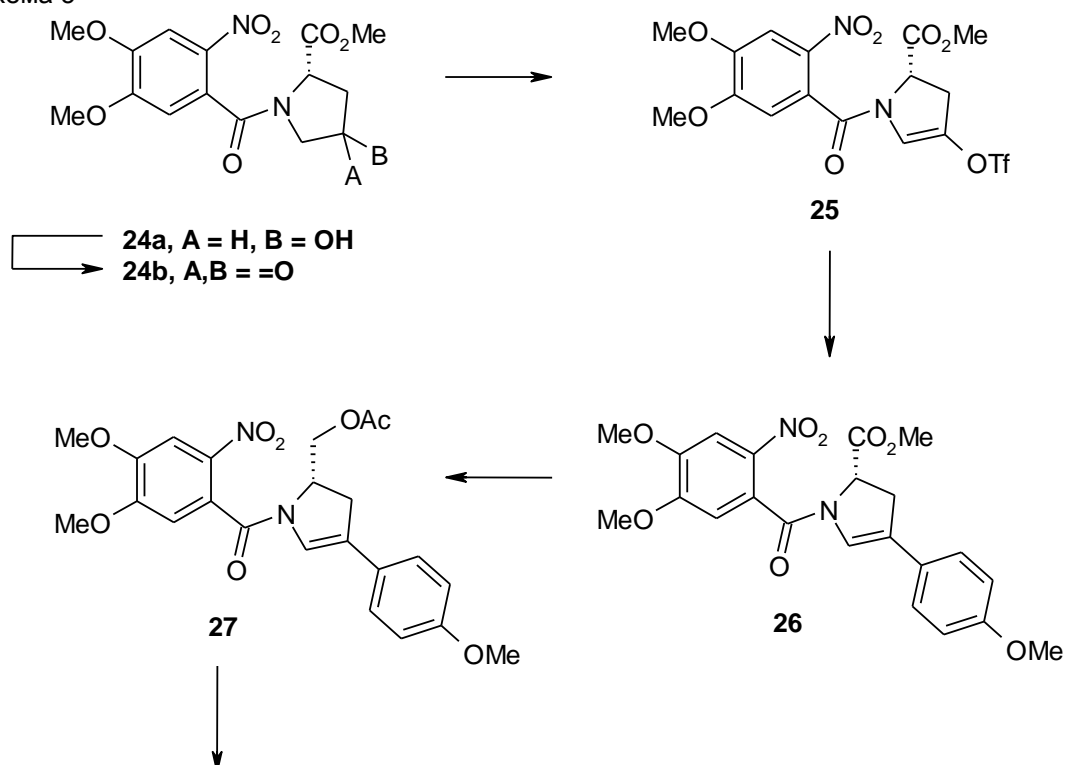


Схема 5



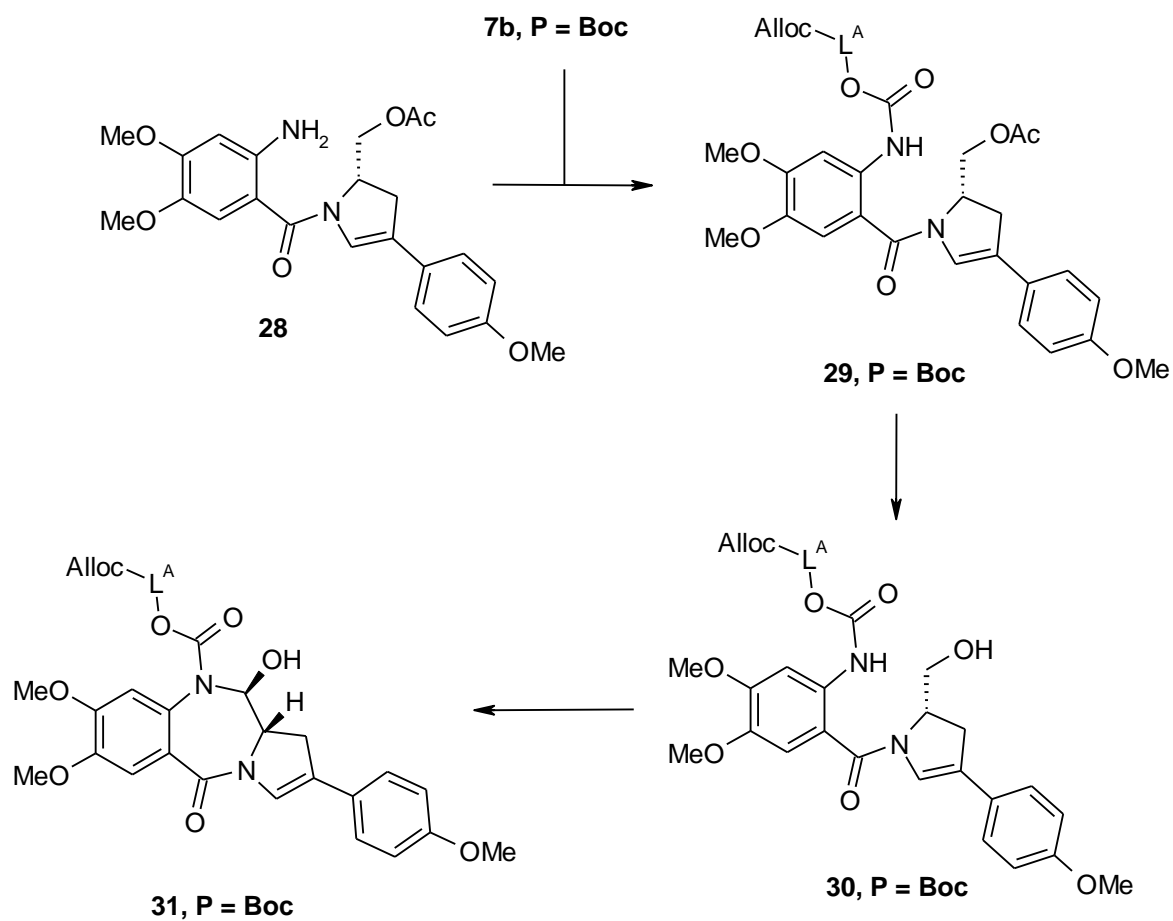


Схема 6

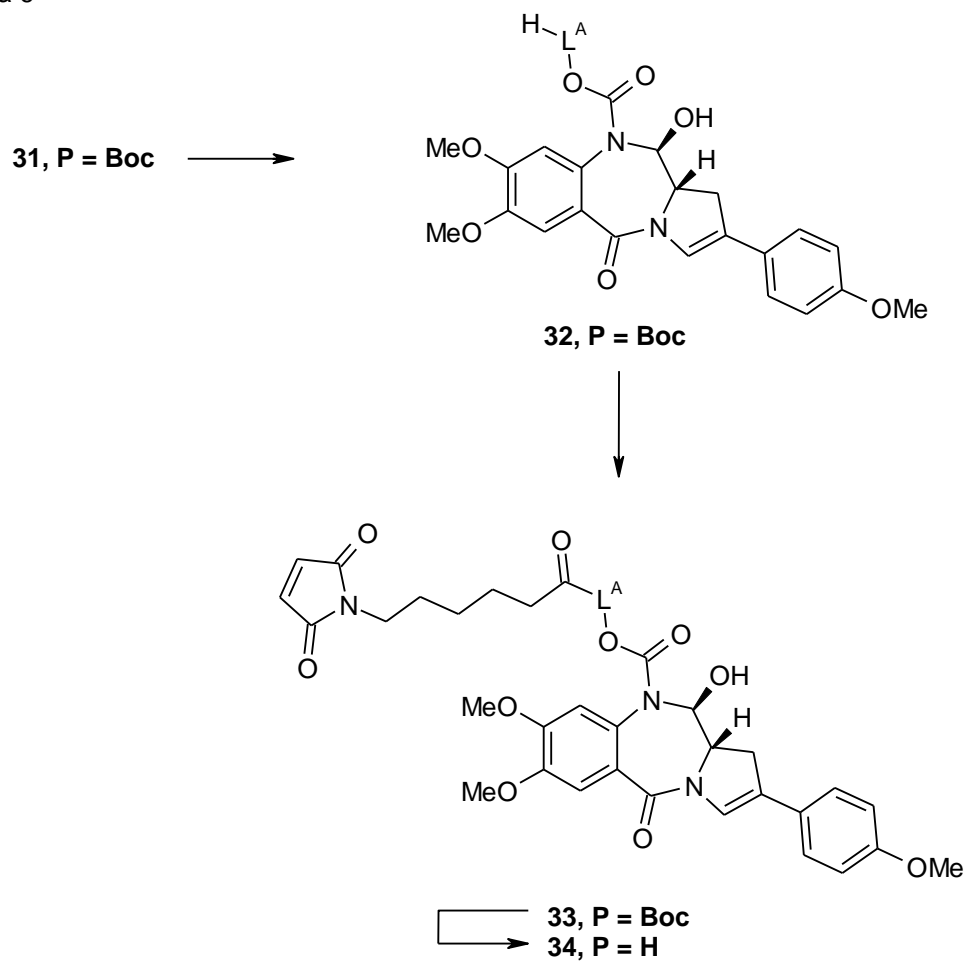


Схема 7

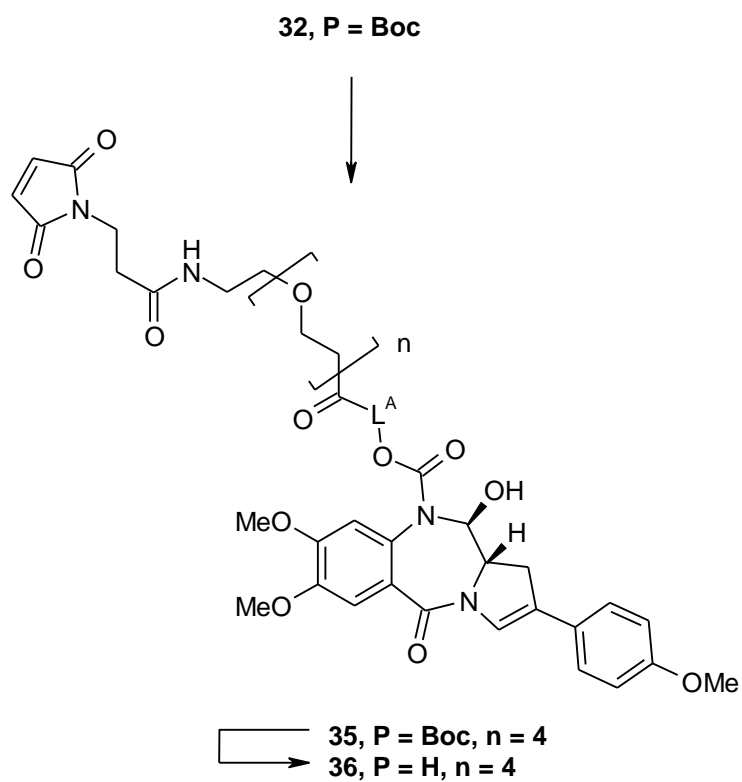


Схема 8

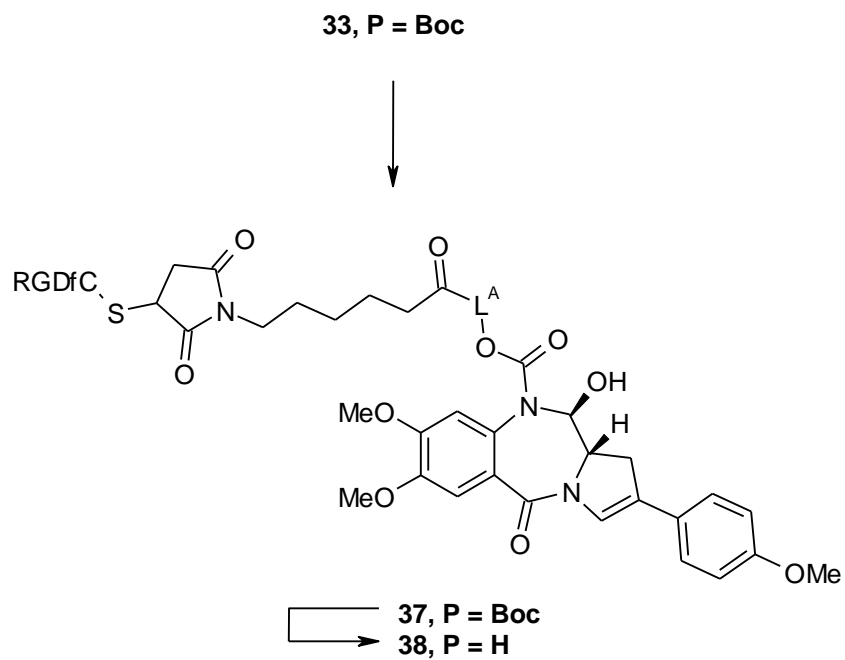
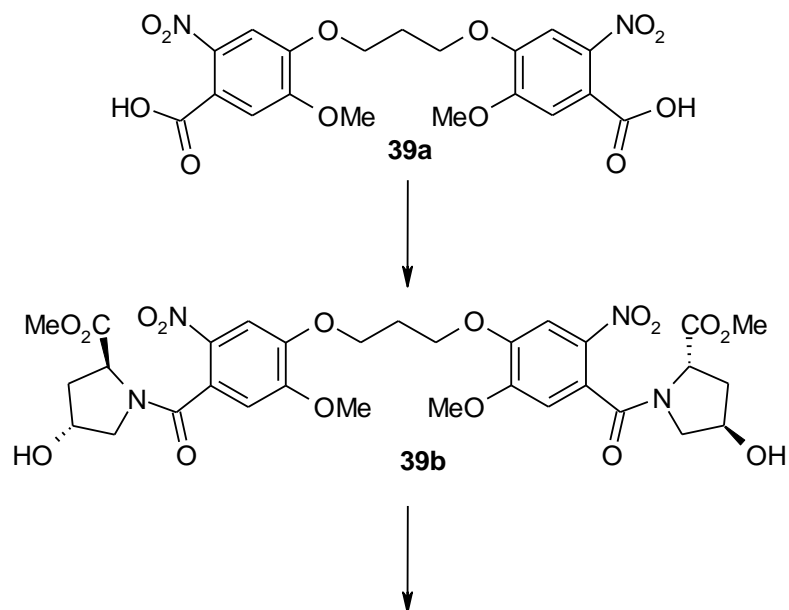
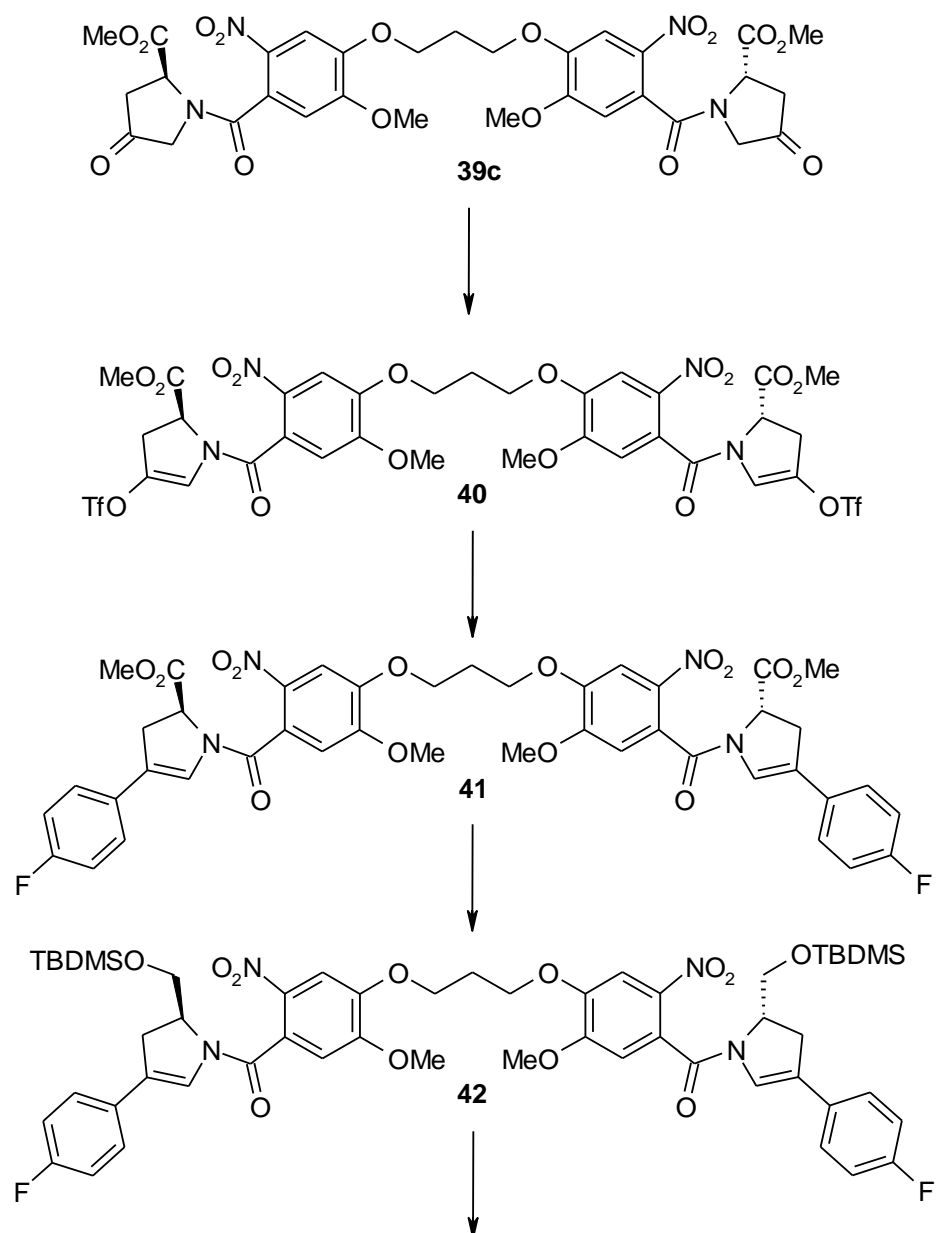
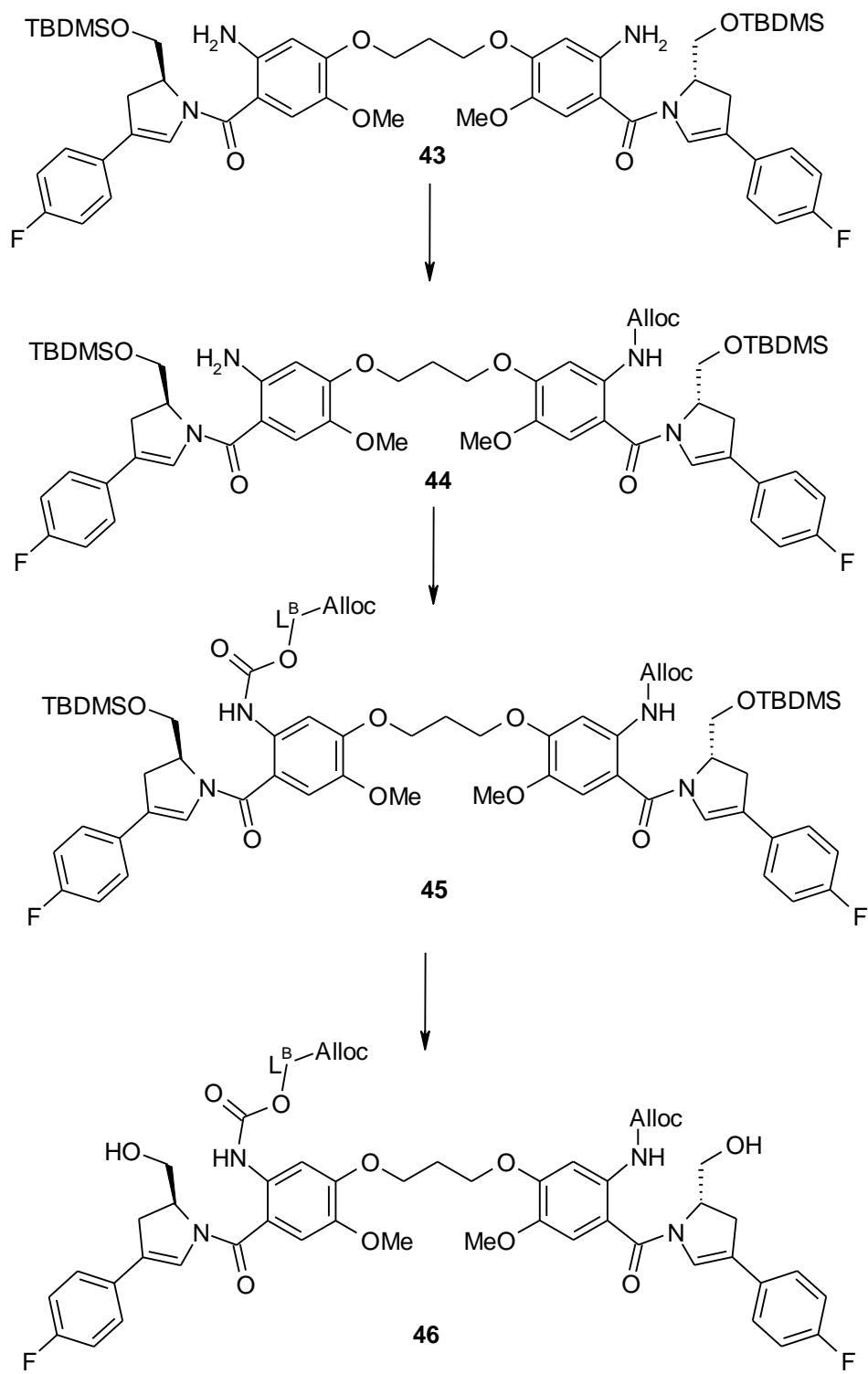


Схема 9







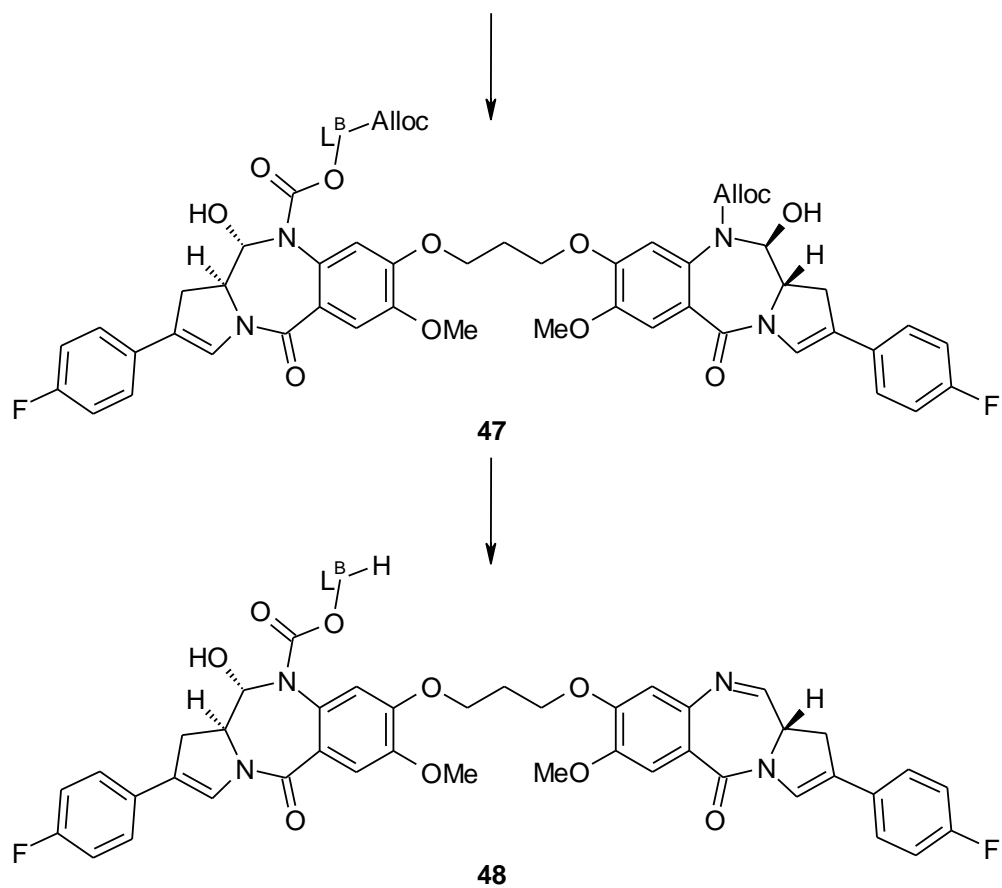
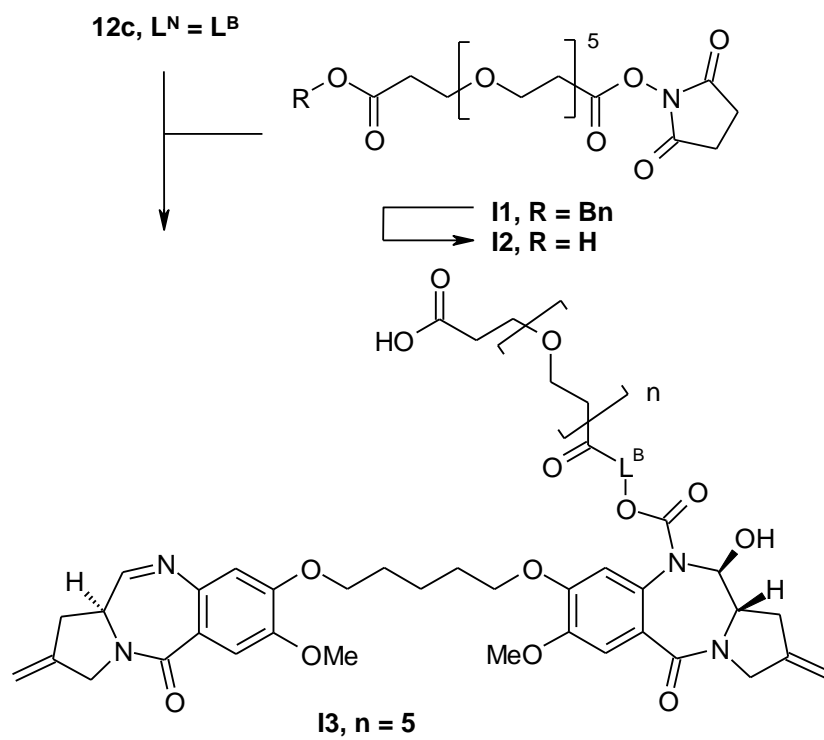


Схема 10



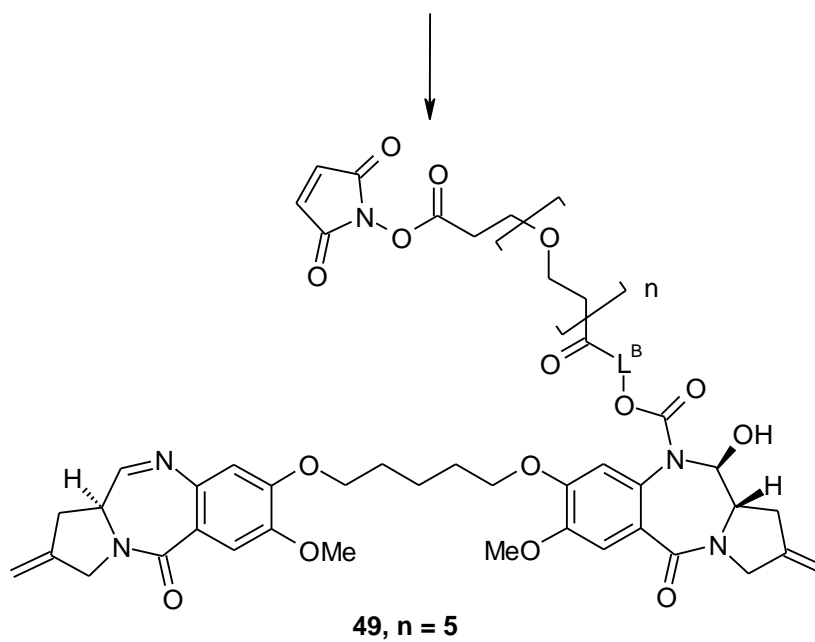
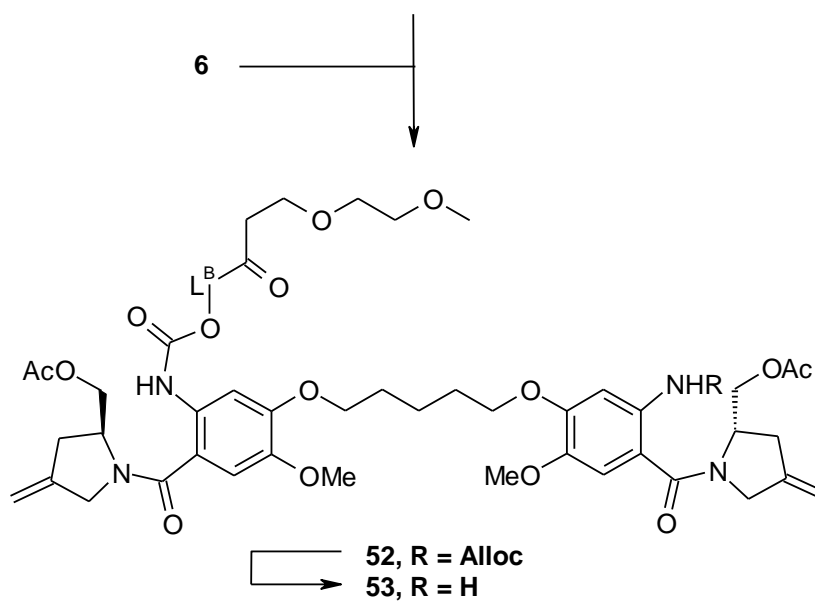
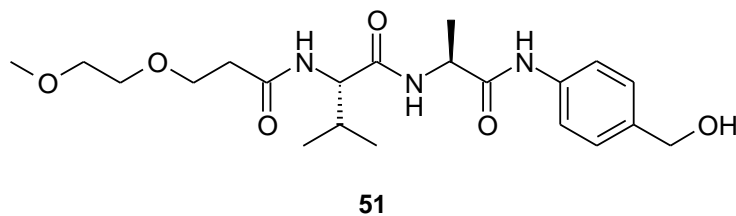
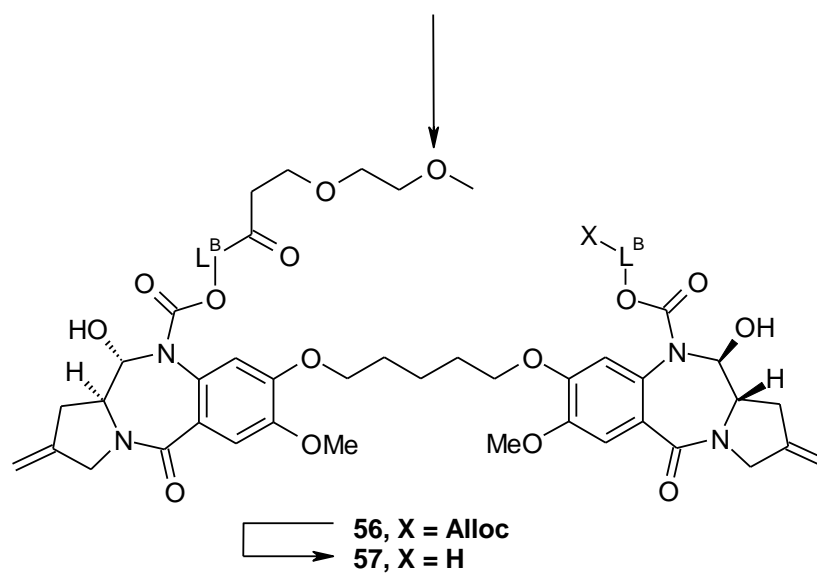
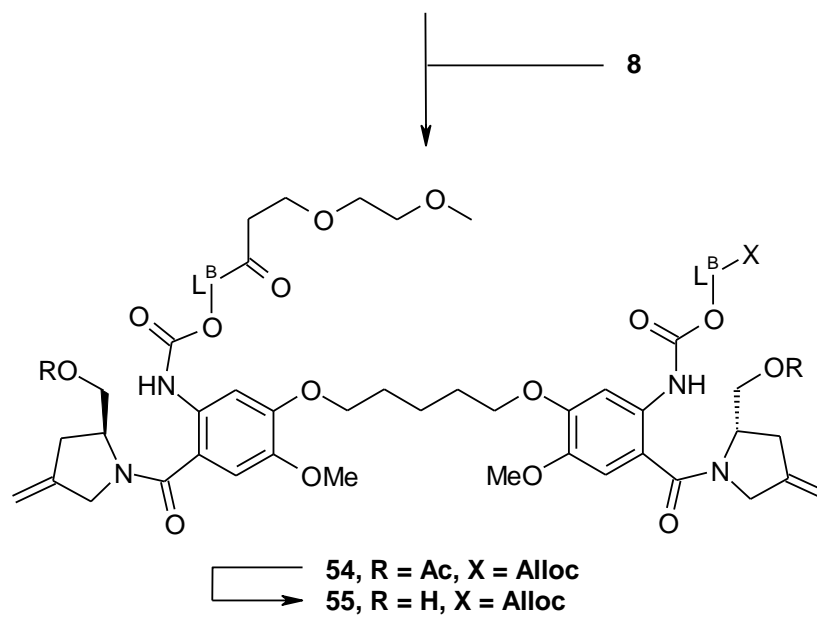


Схема 11





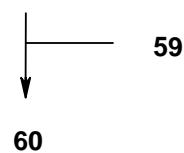
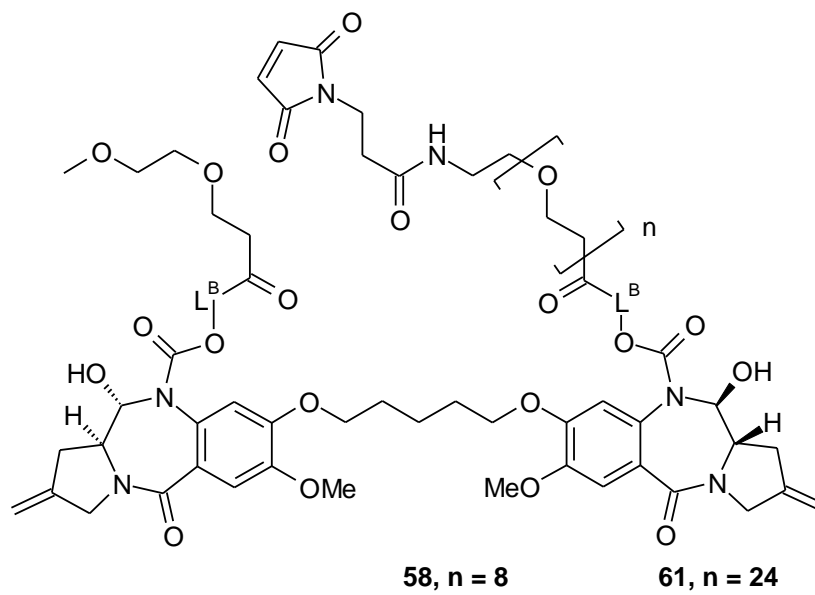
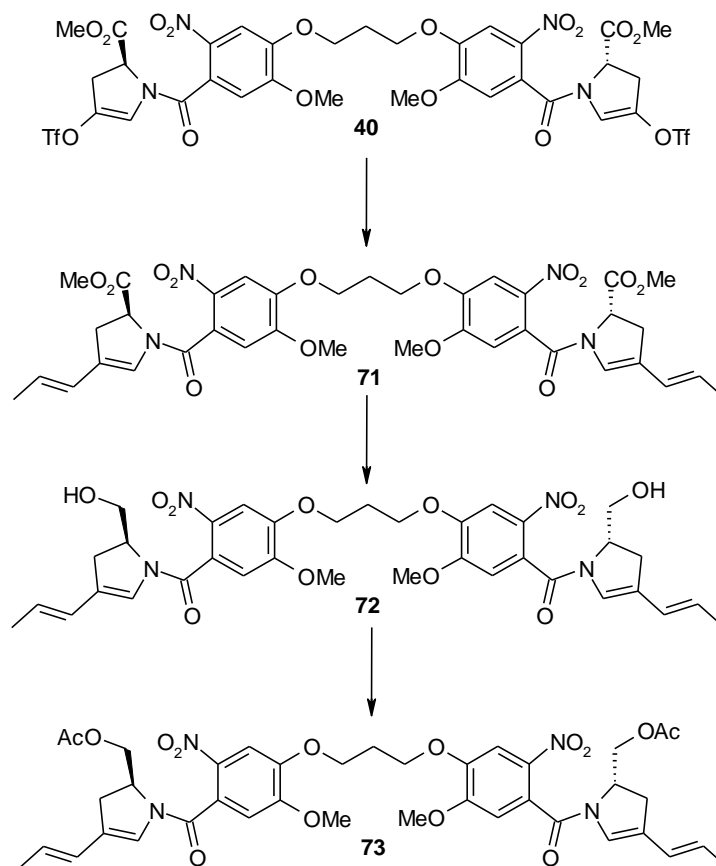
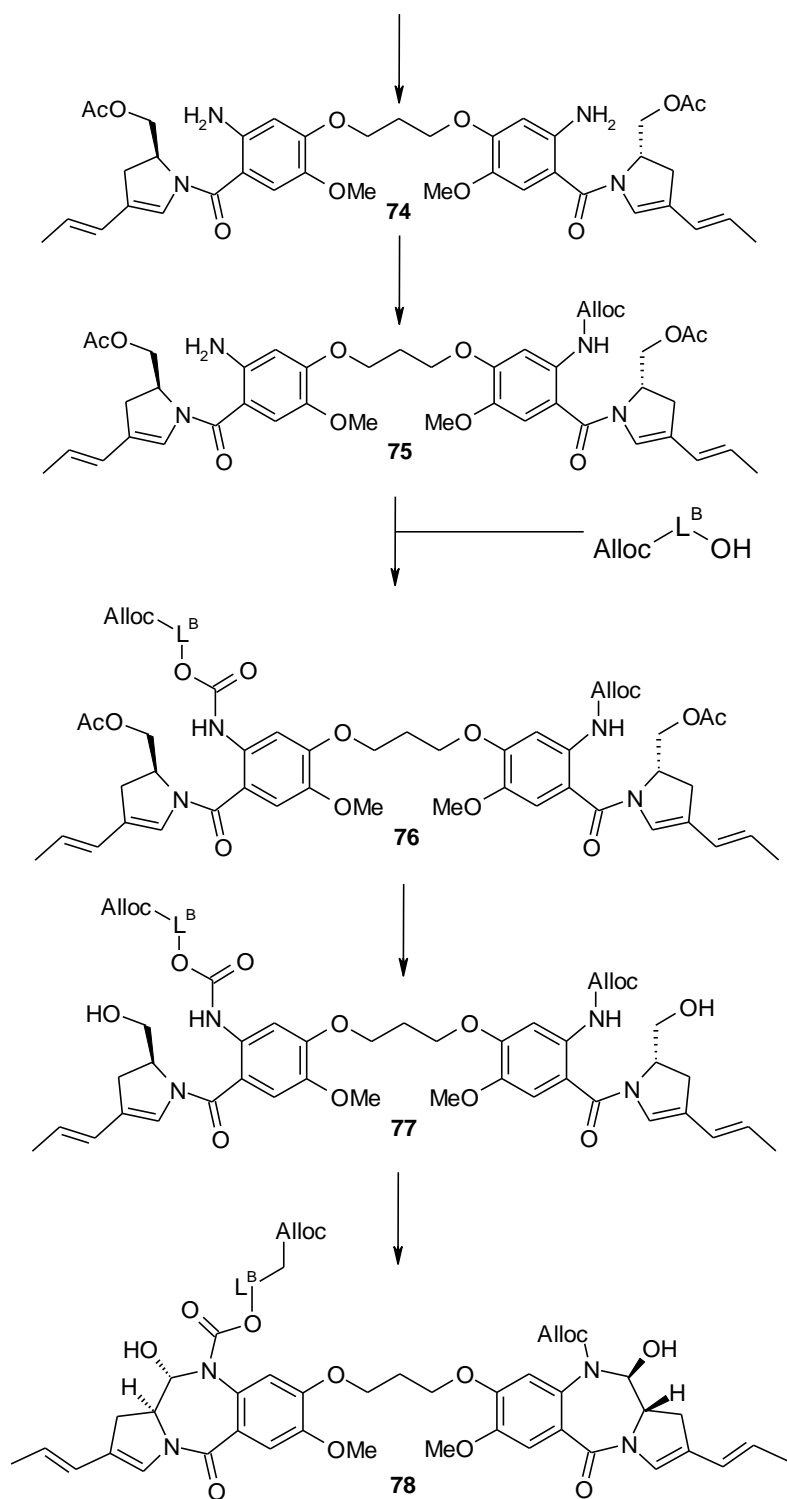
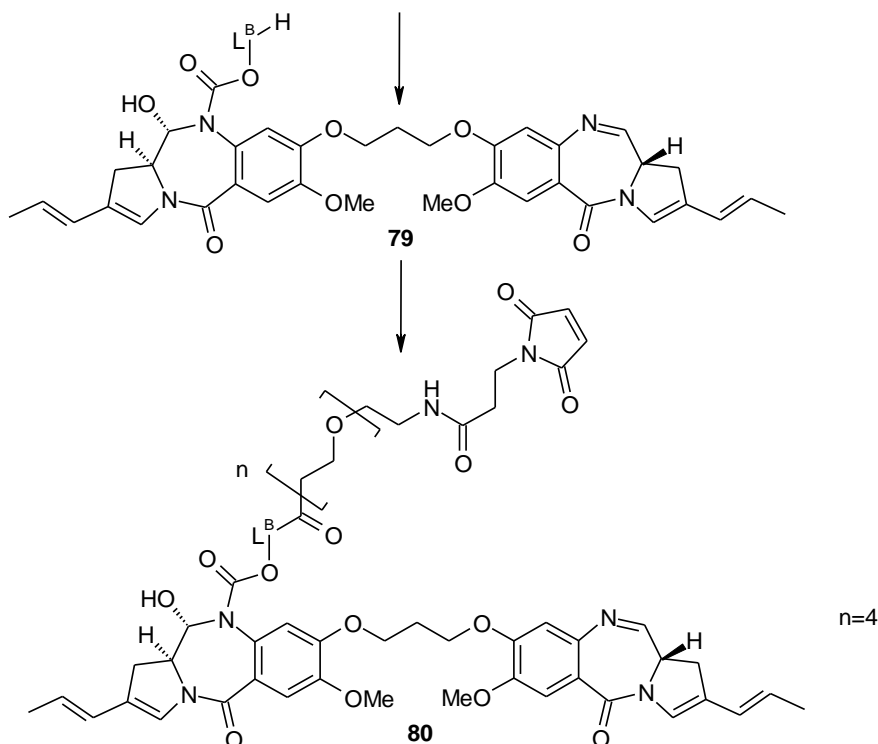


Схема 15







Даний винахід далі буде додатково описаний із посиланням на наступні необмежуючі Приклади. Інші варіанти реалізації даного винаходу можуть здійснюватися фахівцями в даній області техніки на основі зазначених варіантів реалізації.

- 5 Оскільки опис усіх джерел, цитованих у даній заявці, може використовуватися фахівцями в даній області техніки для реалізації даного винаходу, зазначені джерела спеціально включені до даної заявки за допомогою перехресного посилання.

Експериментальна частина

Загальна інформація

- 10 За ходом реакцій стежили за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням силікагелю Merck Kieselgel 60 F254 з флуоресцентним індикатором на алюмінієвих пластинках. Візуалізацію ТШХ проводили за допомогою УФ-світла або парів йоду, якщо не вказано інше. Флеш-хроматографію здійснювали на силікагелі Merck Kieselgel 60 F254. Розчинники для екстракції і хроматографії придбали у компанії Fisher Scientific (Великобританія)
- 15 і використовували без додаткового очищення. Усі хімічні реагенти придбали у фірм Aldrich, Lancaster або BDH.

- Умови РХ/МС були наступними: ВЕРХ (Waters Alliance 2695) проводили з використанням води (А) (мурашина кислота 0,1 %) та ацетонітрилу (В) (мурашина кислота 0,1 %) як рухомої фази. Градієнт: початковий склад: 5 % В протягом 1,0 хв, потім від 5 % В до 95 % В протягом 3
- 20 хв. Ізократичне елюювання протягом 0,5 хв 95 % В, а потім повертали до 5 % В протягом 0,3 хвилин. Загальний час градієнтного аналізу склав 5 хв. Швидкість потоку 3,0 мл/хв. За допомогою трійника з нульовим мертвим об'ємом вводили до мас-спектрометра 400 мкл. Діапазон довжин хвиль детектування: 220-400 нм. Тип детектора: діодна матриця (535 сканувань). Колонка: Phenomenex® Onyx Monolithic C18, 50 × 4,60 мм.

- 25 Використовували наступний спосіб напівпрепаративної ВЕРХ: Зворотно-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) проводили на колонках Zorbax Eclipse XDB C-18 наступних розмірів: 150 × 4,6 мм для аналітичної та 250 × 9,4 мм для препаративної хроматографії. Усі ВЕРХ випробування проводили при градієнтних умовах: початковий фіксований склад 5 % В, потім – до 50 % В протягом 20 хв, ізократичний режим протягом 5 хв
- 30 при 50 % В, потім градієнт 50 % В – 100 % В протягом 2 хв, ізократичний режим протягом 3 хв при 100 % В, повертали до 5 % В протягом 2 хв та ізократичний режим протягом 3 хв. Загальний час градієнтного аналізу становив 35 хв. Використовувані елюенти являли собою розчинник А (Н₂О з 0,02 % ТФО) та розчинник В (СН₃СН з 0,02 % ТФО). Використовували наступні швидкості потоку: 1,20 мл/хв для аналітичної та 5,00 мл/хв. для препаративної ВЕРХ.

- 35 Сполука 2 - хлорид (S)-2-(метоксикарбоніл)-4-метилєпіролідінію
Застосування сполуки 2 для отримання РВД сполук також описане у WO 2007/085930.
Сполуку 2 можна отримати з транс-4-гідроксипроліну, як описано у WO 2007/085930, яка

включена до даної заявки за допомогою посилання. Зокрема, Приклад 13, у якому описане отримання солі ТФО сполуки 2, є найбільш суттєвим.

Альтернативно, сполуку 2 можна отримати зі сполуки 1, як описано нижче.

(S)-1-трет-бутил 2-метил-4-метилепіролідін-1,2-дикарбоксилат

5 До розчину сполуки 1 (10,92 г, 48 ммоль, 1 екв.) у ДМФА (270 мл) при перемішуванні додавали карбонат калію (19,92 г, 14 ммоль, 3 екв.). Отриману білу суспензію перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв, після чого додавали йодметан (21,48 г/9,5 мл, 151 ммоль, 3,15 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 3 днів. ДМФА видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з одержанням жовтого залишку, який обробляли етилацетатом та водою. Органічний шар відокремлювали, а водну фазу екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари промивали водою, сольовим розчином та сушили над сульфатом магнію. Етилацетат видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням технічного продукту у вигляді жовтої олії. Технічний продукт очищали за допомогою флеш-хроматографії [85 % н-гексан/15 % етилацетат] з отриманням продукту у вигляді безбарвної олії (див. також F Manfré et al., J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065).

Хлорид (S)-2-(метоксикарбоніл)-4-метилепіролідінію

20 До сполуки (S)-1-трет-бутил-2-метил-4-метилепіролідін-1,2-дикарбоксилат (13,67 г, 56,6 ммоль, 1 екв.) при кімнатній температурі додавали розчин соляної кислоти в діоксані (4М, 63 мл, 254,4 ммоль, 4,5 екв.). Спостерігали бурхливе виділення газу, що вказує на виділення CO₂ і видалення Вос-групи. Продукт випадав в осад у вигляді твердої речовини білого кольору, потім додавали додаткову порцію діоксану для покращення перемішування і реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом години, а потім розбавляли ефіром. Продукт, що випав в осад, відокремлювали вакуумним фільтруванням та промивали додатковою порцією ефіру. Після висушування на повітрі одержували цільовий продукт 2 у вигляді білого порошку (9,42 г, 94 %) (див. також P Herdwiijn et al., Canadian Journal of Chemistry. 1982, 60, 2903-7).

Сполука 3

Сполуку 3 можна отримати, як описано у WO 2006/111759 і джерелі Gregson et al.

Сполука 4

30 Сполуку 4 можна отримати зі сполуки 3 та сполуки 2.

До суспензії оксалілхлориду (9,1 г, 6,25 мл, 71,7 ммоль, 3 екв.) та сполуки 3 (11,82 г, 23,9 ммоль, 1 екв.) у безводному ДХМ (180 мл) при перемішуванні при кімнатній температурі додавали каталітичну кількість безводного ДМФА (0,5 мл). Після додавання ДМФА спостерігали інтенсивне виділення газу й реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом 18 годин у круглодонній колбі, яка була забезпечена хлоркальцієвою трубкою. Отриманий прозорий розчин упарювали при зниженому тиску і твердий залишок розтирали в ефірі. Твердий продукт відокремлювали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали додатковою порцією ефіру та сушили у вакуумі при 40 °C протягом 1,5 години. Отриману тверду речовину потім додавали порціями до суспензії сполуки 2 (9,35 г, 52,6 ммоль, 2,2 екв.) у TEA (12,08 г, 119,6 ммоль, 5 екв.) й безводному ДХМ (110 мл) при постійному охолодженні від -40 до -50 °C в бані сухий лід/ацетонітрил. Реакційну суміш залишали перемішуватися при -40 °C протягом 1 години, а потім до досягнення кімнатної температури, після чого за допомогою РХ/МС підтверджували повне витрачання початкового реагента. Реакційну суміш розбавляли додатковою порцією ДХМ та промивали послідовно водним розчином соляної кислоти (1М, 2 × 200 мл), насиченим водним розчином бікарбонату натрію (2 × 250 мл), водою (250 мл), сольовим розчином (250 мл), сушили над сульфатом магнію. ДХМ видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді жовтої піни (13,94 г, 79 %). Результати випробувань: R_T 3,95 хв; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 741 ([M+1]⁺; 100).

Сполука 5

50 Сполуку 5 можна отримати зі сполуки 4 в три етапи через біс-спирт і біс-ацетат.

Біс-спирт

55 До розчину складного ефіру 4 (1,05 г, 142 ммоль, 1 екв.) у безводному ТГФ (10 мл) в атмосфері азоту при 0 °C (льодяна баня) додавали однією порцією твердий боргідрид літію (0,093 г, 4,3 ммоль, 3 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при 0 °C протягом 30 хвилин, а потім залишали до досягнення кімнатної температури, при цьому спостерігали випадання в осад помаранчевої в'язкої речовини. Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом додаткових 2 годин і потім охолоджували на льодяній бані та обробляли водою (20 мл) з отриманням жовтої суспензії. Обережно додавали соляну кислоту (1М) (інтенсивне виділення газу!) до завершення виділення газу. Реакційну суміш екстрагували етилацетатом (4 × 50 мл) і об'єднані органічні шари промивали водою (100 мл), сольовим

розчином (100 мл) та сушили над сульфатом магнію. Етилацетат видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням продукту, який являє собою біс-спирт, у вигляді жовтої піни (0,96 г, 99 %). Реакцію повторювали з 12,4 г з отриманням 11,06 г продукту (96 %). Результати випробувань: R_T 3,37 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 685 ($[M+1]^+$; 100).

Біс-ацетат

До розчину біс-спирту (11,46 г, 16,73 ммоль, 1 екв.) та триетиламіну (5,07 г, 6,98 мл, 50,2 ммоль, 3 екв.) у безводному ДХМ (200 мл) при перемішуванні при 0 °С в атмосфері азоту додавали по краплях розчин ацетилхлориду (3,4 г/3,1 мл, 43,5 ммоль, 2,6 екв.) у безводному ДХМ (100 мл). Реакційну суміш залишали до досягнення кімнатної температури й продовжували перемішувати протягом однієї години. За допомогою ТШХ та РХ/МС визначали завершення реакції. Реакційну суміш промивали сольовим розчином (200 мл) й сушили над сульфатом магнію. Після видалення ДХМ за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували технічний продукт. За допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: від 20 % н-гексан/80 % етилацетат до 10 % н-гексан/90 % етилацетат] отримували чистий біс-ацетат у вигляді жовтої піни (10,8 г, 84 %). Результати випробувань: R_T 3,35 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 769 ($[M+1]^+$; 100).

Сполука 5

До розчину біс-ацетату (5,56 г, 7,24 ммоль, 1 екв.) в етанолі (250 мл) та оцтової кислоти (65 мл) додавали цинковий порошок (14,2 г, 2,17 ммоль, 30 екв.). Реакційну суміш при перемішуванні кип'ятили зі зворотним холодильником, в результаті жовте забарвлення розчину зникало (також спостерігали агрегацію цинку, яка утруднює перемішування реакційної суміші). Реакцію проводили протягом однієї години, після чого за допомогою РХ/МС підтвердили завершення реакції. Реакційну суміш охолоджували, фільтрували через целіт і фільтрувальну подушку та промивали ДХМ. Фільтрат промивали водою (3 × 500 мл), насиченим водним розчином бікарбонату натрію (2 × 250 мл), сольовим розчином (500 мл) та сушили над сульфатом магнію. За допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували продукт 5 у вигляді білуватої піни (4,71 г, 92 %). Результати випробувань: R_T 3,33 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 709 ($[M+1]^+$; 100).

Сполука 6

Сполуку 6 можна отримати зі сполуки 5 в три етапи.

Моно-Алос-продукт

До розчину сполуки 5 (4,145 г, 5,8 ммоль, 1 екв.) та піридину (0,106 г/0,11 мл, 11,1 ммоль, 1,9 екв.) у безводному ДХМ (500 мл) при -78 °С (баня сухий лід/ацетон) додавали по краплях розчин алілхлороформіату (0,634 г/0,56 мл, 5,6 ммоль, 0,9 екв.) у безводному ДХМ (150 мл). Реакційну суміш перемішували при -78 °С протягом 1 години і потім залишали до досягнення кімнатної температури. Реакційну суміш промивали насиченим водним розчином сульфату міді (2 × 300 мл), водою (400 мл), сольовим розчином (400 мл) і сушили над сульфатом магнію. За допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували технічний продукт у вигляді піни темного кольору. Після очищення за допомогою флеш-хроматографії [40 % н-гексан/60 % етилацетат – 5 % метанол/95 % етилацетат] отримували біс-алос-продукт (0,84 г), цільовий моно-алос-продукт (1,94 г, 44 %) і відновлений біс-анілін (0,81 г).

Результати випробувань: R_T 3,32 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 793 ($[M+1]^+$; 100); МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 791 ($[M-1]^-$; 100).

Ізоціанат

До розчину моно-алос-продукту (0,106 г, 0,134 ммоль, 1 екв.) і трифосгену (0,015 г, $4,8 \times 10^{-2}$ ммоль, 0,36 екв.) у безводному толуолі (5 мл) при перемішуванні в атмосфері азоту при -10 °С додавали триетиламін (0,018 г/25 мкл, 0,18 ммоль, 1,35 екв.). Через 1 годину за допомогою ІЧ-спектроскопії визначали ізоціанат при 2268 см^{-1} і реакційну суміш залишали до досягнення кімнатної температури.

Сполука 6

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин спирту 6а (0,106 г, 0,15 ммоль, 1,1 екв.) та триетиламіну (0,018 г, 25 мкл, 0,18 ммоль, 1,35 екв.) у безводному ТГФ (5 мл). Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 4 годин, після чого за допомогою ТШХ виявляли утворення нового продукту. Реакційну суміш випарювали насухо і обробляли ДХМ та водою. Водний шар відокремлювали й органічну фазу промивали сольовим розчином (100 мл) та сушили над сульфатом магнію. За допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували технічний продукт у вигляді жовтої олії, яку очищали за допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 40 % н-гексан/60 % етилацетат – 20 % н-гексан/80 % етилацетат, з кроком підвищення концентрації етилацетатату 5 %] з отриманням

цільового продукту у вигляді білої піни (0,092 г, вихід 45 %).

Результати випробувань: R_T 4,05 хв; $MC (ES^+)$ m/z (відносна інтенсивність) 1540 ($[M+2]^+$; 30); 1557 ($[M+18]^+$; 50); $MC (ES^-)$ m/z (відносна інтенсивність) 1585 ($[M - +2 Na]^+$; 50).

Сполука 7

5 Сполуку 7 можна отримати зі сполуки 6 в два етапи.

Біс-деацетильований продукт

До розчину ацетату 6 (0,135 г, $8,8 \times 10^{-2}$ ммоль, 1 екв.) у безводному ТГФ (7 мл) при перемішуванні при $-78^\circ C$ (сухий лід/ацетон) додавали по краплях за допомогою шприца розчин Супергідриду™ у ТГФ (1М, 0,35 мл, 0,35 ммоль, 4 екв.). Реакційну суміш залишали при
10 перемішуванні при $-78^\circ C$ протягом однієї години, після чого за допомогою РХ/МС виявляли відсутність початкового реагента й утворення двох нових сполук, які відповідають моно- та біс-деацетильованому продукту. До реакційної суміші додавали додаткову аліквоту Супергідриду™ (1М, 0,35 мл, 0,35 ммоль, 4 екв.) та продовжували перемішувати протягом ще однієї години. Після цього за допомогою РХ/МС виявляли повну конверсію в біс-деацетильований продукт. До
15 реакційної суміші додавали лимонну кислоту (1М, 1 мл) (інтенсивне виділення газу!), потім зазначену суміш залишали до досягнення кімнатної температури, після чого додавали додаткову аліквоту лимонної кислоти (1М, 1 мл). Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску і отриманий залишок обробляли етилацетатом (25 мл) та водою (25 мл). Водну фазу відокремлювали й шар етилацетату промивали водою (25 мл),
20 сольовим розчином (25 мл) та сушили над сульфатом магнію. Після видалення розчинника за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували технічний продукт у вигляді жовтої олії, яку очищали флеш-хроматографією [градієнтне елювання: етилацетат \rightarrow 1 % метанол/99 % етилацетат – 2 % метанол/98 % етилацетат] з отриманням чистого продукту у вигляді безбарвного склоподібного продукту (0,056 г, 44 %). Результати випробувань: R_T 3,78
25 хв; $MC (ES^+)$ m/z (відносна інтенсивність) 1456 ($[M+1]^+$; 75).

Сполука 7

До розчину біс-деацетильованого продукту (0,042 г, $2,9 \times 10^{-5}$ моль, 1 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) в атмосфері азоту додавали однією порцією періодат Деса-Мартіна (0,026 г, $6,1 \times 10^{-5}$ моль, 2,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин, після
30 чого за допомогою РХ/МС підтверджували завершення реакції. Каламутну суспензію фільтрували, промиваючи ДХМ (20 мл). Фільтрат промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію (25 мл), водою (25 мл), сольовим розчином (25 мл) і сушили над сульфатом магнію. Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням продукту 7 у вигляді білуватої піни (0,035 г, 84 %). Результати випробувань: R_T 3,70
35 хв; (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1451 ($[M+1]^+$; 30).

Сполука 14

Сполуку 14a або 14b можна отримати зі сполуки 7 через сполуку 8. Захисна група Аллос у сполуці 7 може бути видалена у відповідних умовах, наприклад, з використанням тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) у присутності піролідину. У зазначених умовах також
40 видаляється захисна група Fmoc. Альтернативно, група Fmoc може бути видалена на окремому етапі, або до, або після видалення групи Аллос, з використанням піперидину у ДМФА. Продукт, отриманий на етапі видалення захисної групи, являє собою імін карбіноламінний продукт, який містить імінну функціональну групу в положенні N10-C11 одного PBD мономеру та карбіноламінну функціональну групу в положенні N10-C11 іншого мономеру, де зазначений карбіноламін містить лінкер $-C(=O)-L^1-NH_2$ в положенні N10.

Імін-карбіноламін може взаємодіяти з MC-OSu в присутності основи з отриманням сполуки 8. Див., наприклад, Dubowchik et al., Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869.

Захисна група бічного ланцюга амінокислоти може потім бути видалена з сполуки 8, наприклад, у присутності кислоти. Отриманий продукт можна потім піддавати кон'югуванню з
50 відповідним антитілом, яке містить тіолову функціональну групу, з отриманням сполуки 9.

У одному прикладі антитіло можна обробляти ДТТ для відновлення міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Отримане антитіло, яке містить вільні тіолові групи, можна потім піддавати взаємодії з малеїмід-вмісною сполукою, отриманою зі сполуки 8, з утворенням сполуки 9. Сполука 9 може бути очищена, наприклад, діафільтрацією. Див., наприклад,
55 Dubowchik et al., Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869.

Сполука 18

До суспензії N-гідроксисукциніміду (1,44 г, 12,5 ммоль, 1,1 екв.) та N-аллос-фенілаланіну (17) (2,83 г, 11,35 ммоль, 1 екв.) у безводному ДХМ (120 мл) при $0^\circ C$ додавали дициклогексилкарбодіімід (2,46 г, 11,92 ммоль, 1,05 екв.). Суміш перемішували при $0^\circ C$
60 протягом 30 хвилин, потім при кімнатній температурі протягом 16 годин. Реакційну суміш

фільтрували й фільтрат упарювали при зниженому тиску. Осад знову розчиняли в ДХМ (50 мл), витримували протягом 1 години й фільтрували для видалення дициклогексилсечовини, яка випала в осад. Після упарювання при зниженому тиску отримували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору (3,91 г, 99 %). Результати випробувань: R_T 2,93 хв; (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 369 ($[M+Na]^+$; 50).

Сполука 20

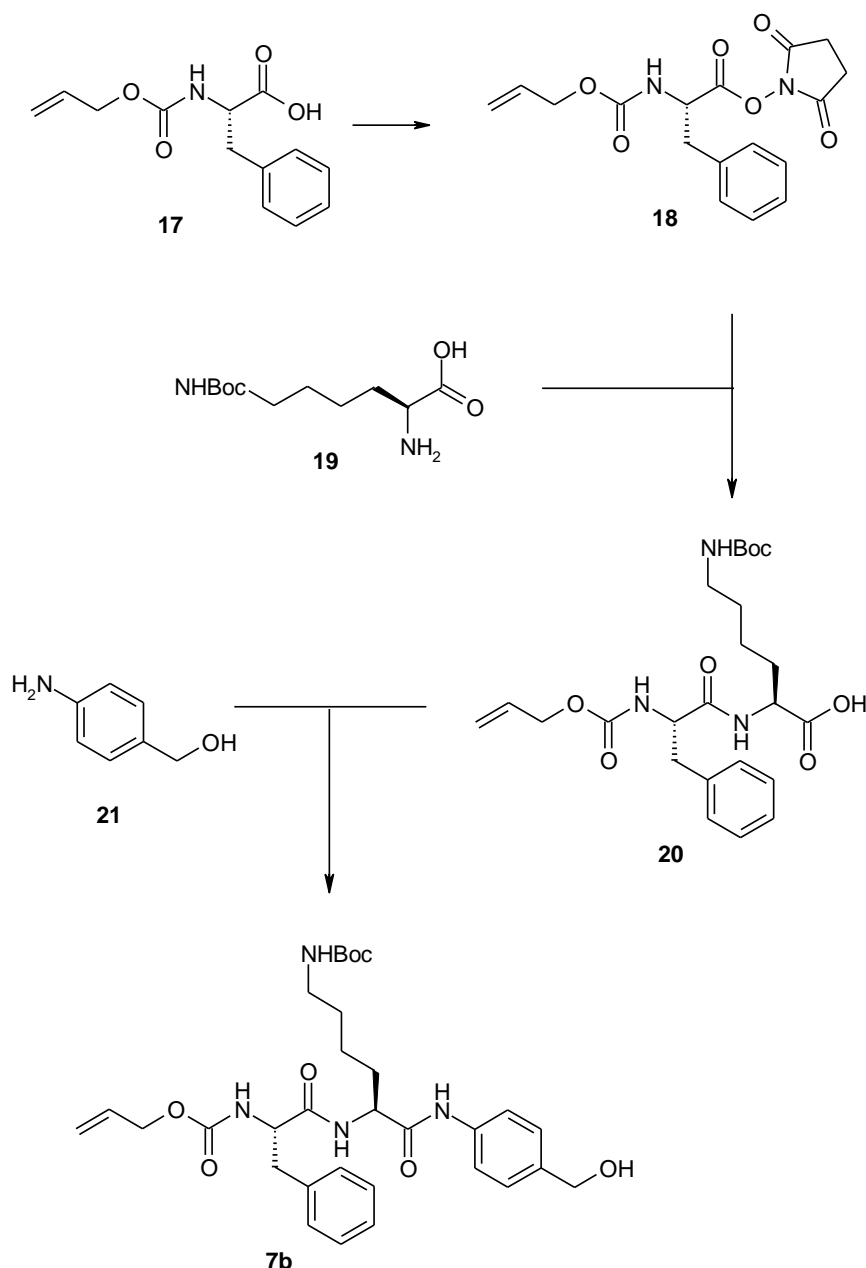
До розчину H-Lys (Boc)-OH (19) (2,92 г, 11,85 ммоль, 1,05 екв.) та $NaHCO_3$ (1,04 г, 12,42 ммоль, 1,1 екв.) у ТГФ (50 мл) і H_2O (100 мл) додавали розчин сукциніміду (18) (3,91 г, 11,29 ммоль, 1 екв.) у ТГФ (50 мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин і ТГФ упарювали при зниженому тиску. Доводили рН до рН 3-4, в результаті чого випадала в осад біла в'язка речовина. Отриману суміш екстрагували етилацетатом (2 × 250 мл) і об'єднані екстракти промивали H_2O (200 мл), сольовим розчином (200 мл), сушили ($MgSO_4$) й упарювали при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді білої піни (4,89 г, 91 %). Результати випробувань: R_T 3,03 хв; $MC (ES^+)$ m/z (відносна інтенсивність) 478 ($[M+1]^+$; 80).

Сполука 7b

До розчину п-амінобензилового спирту (21) (1,32 г, 10,75 ммоль, 1,05 екв.) і Alloc-Phe-Lys(Boc)-OH (4,89 г, 10,24 ммоль, 1,0 екв.) у безводному ТГФ (75 мл) додавали EEDQ (2,66 г, 10,75 ммоль, 1,05 екв.). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Розчинник упарювали при зниженому тиску з одержанням твердої речовини блідо-коричневого кольору. Зазначену тверду речовину розтирали в диетиловому ефірі та фільтрували, промиваючи надлишком диетилового ефіру. Після цього отримували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору (4,54 г, 76 %). Результати випробувань: R_T 3,08 хв; (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 583,8 ($[M+1]^+$; 100).

Синтез сполуки 7b показаний нижче на Схемі 12.

Схема 12



Сполука 9b

До розчину, який містить одну захисну групу Alloc біс-аніліну (6) (0,608 г, 0,77 ммоль, 1,06 екв.) та трифосгену (0,088 г, 0,3 ммоль, 0,39 екв.) у безводному ТГФ (5 мл) при перемішуванні в атмосфері азоту при -10 °С додавали триетиламін (0,18 г, 0,25 мл, 1,79 ммоль, 2,3 екв.). Реакційну суміш залишали до нагрівання до кімнатної температури, зразок обробляли метанолом і виявляли за допомогою РХ/МС як метилкарбамат.

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин бензилового спирту (7b) (0,422 г, 0,72 ммоль, 1,0 екв.) та триетиламіну (0,18 г, 0,25 мл, 1,79 ммоль, 2,3 екв.) у безводному ТГФ (20 мл). Реакційну суміш гріли при 60-65 °С протягом 4 годин, потім залишали при перемішуванні протягом 18 годин при кімнатній температурі, після чого за допомогою РХ/МС виявляли утворення нового продукту. Реакційну суміш упарювали насухо з отриманням технічного продукту у вигляді жовтої олії, яку очищали за допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елювання: 50 % н-гексан/50 % етилацетат – 10 % н-гексан/90 % етилацетат з кроком підвищення концентрації 10 %] з отриманням цільового продукту у вигляді білої піни (0,385 г, 38 %). Результати випробувань: R_T 3,78 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1402,8 ($[M+H]^+$; 15).

Сполука 10b

До розчину ацетату (9b) (0,32 г, 0,23 ммоль, 1 екв.) у метанолі (6 мл) додавали розчин K_2CO_3

(0,158 г, 1,15 ммоль, 5 екв.) у H_2O (1 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Метанол упарювали при зниженому тиску, залишок розбавляли H_2O (50 мл) та екстрагували етилацетатом (3×75 мл). Об'єднані етилацетатні екстракти промивали H_2O (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO_4) й упарювали при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді білої піни (0,292 г, 97 %). Результати випробувань: R_T 3,52 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1318,6 ($[\text{M}+1]^+$; 15).

Сполука 11b

До розчину біс-деацетилюваного продукту (10b) (0,292 г, 0,22 ммоль, 1 екв.) у безводному ДХМ (15 мл) в атмосфері азоту додавали однією порцією періодат Деса-Мартіна (0,197 г, 0,465 ммоль, 2,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 3,5 годин, після чого за допомогою РХ/МС підтвердили завершення реакції. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (50 мл) і промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію (3×100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл) та сушили над сульфатом магнію. Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 80 % етилацетат/20 % н-гексан – 100 % етилацетат із кроком підвищення концентрації 5 %] отримували продукт 11b у вигляді жовтої піни (0,235 г, 81 %). Результати випробувань: R_T 3,42 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1314,8 ($[\text{M}+1]^+$; 8).

Сполука 12a

До розчину, біс-Alloc-сполуки (11b) (0,230 г, 0,175 ммоль, 1 екв.) та піролідину (31 мг, 36 мкл, 0,44 ммоль, 2,5 екв.) у безводному ДХМ (10 мл) в атмосфері азоту додавали $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4 мг, $3,5 \times 10^{-6}$ моль, 0,02 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 3 годин, після чого за допомогою РХ/МС виявляли залишок сполуки (11b), який не прореагував. Додавали додаткові еквівалентні кількості піролідину (31 мг, 36 мкл, 0,44 ммоль, 2,5 екв.) і $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4 мг, $3,5 \times 10^{-6}$ моль, 0,02 екв.) й реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ще 18 годин. Підтверджували завершення реакції за допомогою РХ/МС. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (40 мл) і промивали насиченим водним розчином хлориду амонію (100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO_4) та упарювали при зниженому тиску з отриманням жовтої піни. Отриману піну розтирали в диетиловому ефірі з отриманням продукту (0,187 г, 95 %), який використовували без додаткового очищення. Результати випробувань: R_T 2,80 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1128,5 ($[\text{M}+1]^+$; 20).

Сполука 23

До розчину Н-Ala-ОН (3,66 г, 41,08 ммоль, 1,05 екв.) та NaHCO_3 (3,61 г, 43,03 ммоль, 1,1 екв.) у ТГФ (100 мл) і H_2O (100 мл) додавали розчин Alloc-Val-OSu (22) (R_T 2,67 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 321,4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; 57), приготований відповідно до способу одержання сполуки (16)) (11,67 г, 39,0 ммоль, 1 екв.) у ТГФ (50 мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин і ТГФ упарювали при зниженому тиску. Доводили рН до рН 3-4 за допомогою лимонної кислоти з випаданням в осад білої в'язкої речовини. Отриману суміш екстрагували етилацетатом (6×150 мл) і об'єднані екстракти промивали H_2O (200 мл), сольовим розчином (200 мл), сушили (MgSO_4) та упарювали при зниженому тиску з одержанням твердої речовини білого кольору. У результаті розтирання з диетиловим ефіром (надлишком) отримували чистий продукт 23 у вигляді білого порошку (7,93 г, 74 %).

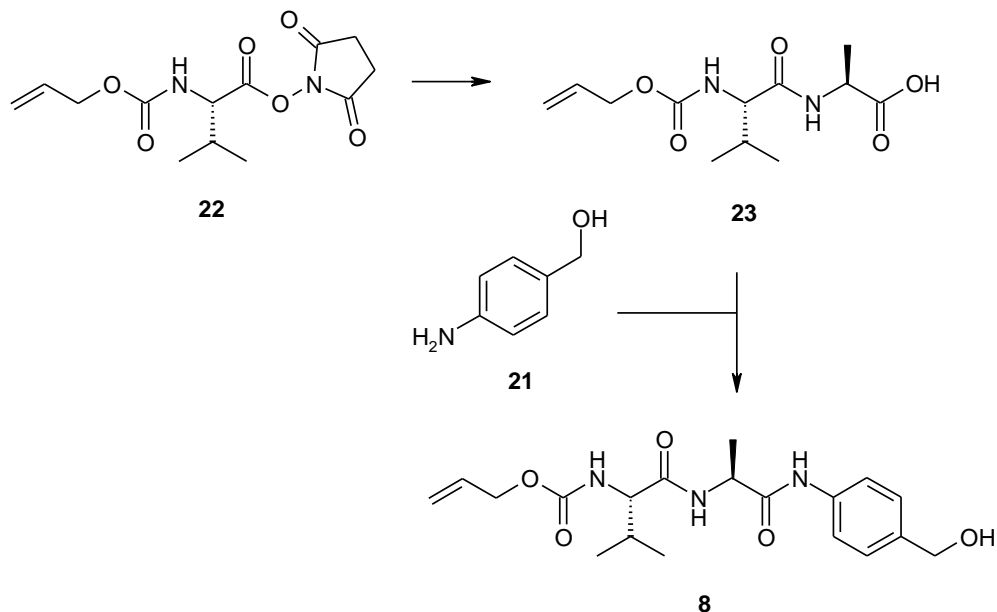
Результати випробувань: R_T 2,17 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 295 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; 63), 273 ($[\text{M}+1]^+$; 60).

Сполука 8

До розчину, п-амінобензилового спирту (21) (2,38 г, 19,3 ммоль, 1,05 екв.) і Alloc-Val-Ala-ОН (5,02 г, 18,4 ммоль, 1,0 екв.) у безводному ТГФ (100 мл) додавали EEDQ (4,79 г, 19,3 ммоль, 1,05 екв.). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин. Розчинник упарювали при зниженому тиску з одержанням твердої речовини блідо-коричневого кольору. Отриману тверду речовину розтирали в диетиловому ефірі й відфільтровували, промиваючи надлишком диетилового ефіру, в результаті чого отримували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору (6,2 г, 89 %). Результати випробувань: R_T 2,50 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 400,6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; 50), 378,6 ($[\text{M}+1]^+$; 60).

Синтез 8 показаний нижче на Схемі 13.

Схема 13



Сполука 9с

До перемішаного розчину біс-аніліну (6) (0,572 г, 0,72 ммоль, 1 екв.), який містить одну захисну групу Аллос, та трифосгену (0,077 г, 0,26 ммоль, 0,36 екв.) у безводному ТГФ (20 мл) в атмосфері азоту при кімнатній температурі додавали триетиламін (0,16 г, 0,22 мл 1,59 ммоль, 2,2 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 40 °С, зразок обробляли метанолом і виявляли за допомогою РХ/МС як метилкарбамат.

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин бензилового спирту (8) (0,4 г, 1,06 ммоль, 1,5 екв.) та триетиламіну (0,109 г, 0,15 мл, 1,08 ммоль, 1,5 екв.) у безводному ТГФ (20 мл). За реакцією стежили за допомогою РХ/МС з інтервалами у 30 хвилин. Через 3 години за допомогою РХ/МС спостерігали утворення продукту, присутність метилкарбамату та моно-аллос-захисненого біс-аніліну (6). Додавали додаткову порцію трифосгену (0,038 г, 0,128 ммоль, 0,18 екв.) та реакції витримували при 40 °С протягом додаткових 18 годин. Реакційну суміш упарювали насухо з отриманням технічного продукту у вигляді жовтої олії, яку очищали за допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 97 % хлороформ/метанол 3 % з кроком підвищення концентрації 0,5 %] з отриманням цільового продукту у вигляді білої піни (0,59 г, 69 %). Результати випробувань: R_T 3,58 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1197 ($[M+1]^+$; 60).

Сполука 10с

До розчину ацетату (9с) (0,338 г, 0,282 ммоль, 1 екв.) у метанолі (8,5 мл) додавали розчин K_2CO_3 (0,195 г, 1,41 ммоль, 5 екв.) у H_2O (1,4 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Метанол випарювали при зниженому тиску, осад розбавляли H_2O (50 мл) та екстрагували етилацетатом (3 × 75 мл). Об'єднані екстракти етилацетату промивали H_2O (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили ($MgSO_4$) та упарювали при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді білої піни (0,298 г, 95 %). Результати випробувань: R_T 3,28 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1113 ($[M+1]^+$; 40).

Сполука 11с

До розчину біс-деацетильованого продукту (10с) (0,39 г, 0,35 ммоль, 1 екв.) у безводному ДХМ (20 мл) у атмосфері азоту додавали однією порцією періодат Деса-Мартіна (0,312 г, 0,74 ммоль, 2,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 3,5 годин, після чого за допомогою РХ/МС показували завершення реакції. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (50 мл) і промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію (3 × 100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл) та сушили ($MgSO_4$). Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 97 % хлороформ/3 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору (0,201 г, 52 %). Результати випробувань: R_T 3,15 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1109 ($[M+1]^+$; 30), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1107 ($[M-1]^-$; 100).

Сполука 12с

До розчину біс-Allos-сполуки (11с) (0,190 г, 0,17 ммоль, 1,0 екв.) та піролідину (61 мг, 71 мкл, 0,86 ммоль, 5,0 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) в атмосфері азоту додавали $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (8 мг, 7×10^{-6} моль, 0,04 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 3 годин із утворенням каламутної суспензії. Розчинник випарювали при зниженому тиску й осад розтирали в етилацетаті з отриманням твердої речовини білуватого кольору, яку відділяли фільтруванням із отриманням продукту (0,13 г, 82 %), який використовували без додаткового очищення. Результати випробувань: R_T 2,55 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 922 ($[\text{M}+1]^+$; 52).

Сполука 13а

До розчину амінодипептиду (12а) (40 мг $3,5 \times 10^{-5}$ моль, 1,0 екв.) і малеїмідкапронової кислоти (8,2 мг, $3,9 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.) у ДХМ (2 мл) та метанолі (1 мл) додавали EEDQ (18,4 мг, $7,45 \times 10^{-5}$ моль, 2,2 екв.). Розчин перемішували при 40 °С протягом 72 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Залишок розчиняли у ДХМ (50 мл) і промивали насиченим водним розчином NaHCO_3 (2 \times 50 мл), H_2O (50 мл), сольовим розчином (50 мл), сушили (MgSO_4) та упарювали при зниженому тиску з одержанням білої піни. Отриману піну розтирали в диетиловому ефірі й фільтрували, промиваючи надлишком диетилового ефіру з одержанням продукту у вигляді твердої речовини білого кольору (36 мг, 78 %). Результати випробувань: R_T 3,27 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1320 ($[\text{M}+1]^+$; 75).

Сполука 13b

До малеїмідної похідної (13а) (65 мг, $4,9 \times 10^{-5}$ моль) при 0 °С додавали холодну трифтороцтову кислоту (13 мл). Розчин перемішували при зазначеній температурі протягом 30 хвилин і трифтороцтову кислоту упарювали при зниженому тиску. Залишок знову розчиняли в безводному ДХМ (5 мл). Розчинник упарювали і залишок розтирали з диетиловим ефіром, і отриману тверду речовину жовтого кольору відфільтровували та сушили у вакуумі (64 мг, 97 %). Результати випробувань: R_T 2,83 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1222 ($[\text{M}+2]^+$; 5).

У результаті поєднання малеїмід-PEG-сукцинімідного реагента зі сполукою 12а або 12b отримували сполуки PBD лікарський засіб-лінкер 15. На Фігурі 1а показані структури сполук PBD лікарський засіб-лінкер MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 15ba, MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 15bb і MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD 15d, де PEG являє собою етиленокси, а PAB являє собою пара-амінобензилоксикарбоніл.

Сполука 15аа

Амінодипептид (12а) (83 мг, $7,4 \times 10^{-5}$ моль, 1 екв.) розчиняли в суміші безводних 10 % ДМФА/ДХМ (2 мл) і додавали малеїмід-4Peg-сукцинімід (353 мкл 250-мілімолярного розчину у безводному ДХМ) з наступним додаванням N, N-диізопропілетиламіну (8,2 мг, 11 мкл, $8,1 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин у атмосфері азоту. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елювання: 100 % хлороформ – 92 % хлороформ/8 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді жовтої піни (85 мг, 76 %). Результати випробувань: R_T 3,13 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1526 ($[\text{M}+1]^+$; 5).

Сполука 15ab

Амінодипептид (12а) (70 мг, $76,2 \times 10^{-5}$ моль, 1 екв.) розчиняли в суміші безводних ДМФА/ДХМ (2 мл) і додавали малеїмід-8Peg-сукцинімід (263 мкл 250-мілімолярного розчину в безводному ДХМ) з наступним додаванням N, N-диізопропілетиламіну (6,9 мг, 9,5 мкл, $6,6 \times 10^{-5}$ моль, 1,06 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин у атмосфері азоту. Розчинник випарювали при зниженому тиску. У результаті очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елювання: 100 % хлороформ – 92 % хлороформ/8 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді піни коричневого кольору (44 мг, 41,5 %). Результати випробувань: R_T 3,20 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1703 ($[\text{M}+2]^+$; 5).

Сполука 15ba (MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-2-(4-амінобутил)-5-бензил-25-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-4,7,23-триоксо-10,13,16,19-тетраокса-3,6,22-триазапентакозанаїдо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-(5-((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагідропірол [2,1-c][1,4]бензо-діазепін-8-ілокси)пентилокси)-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагідропірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат)

До малеїмідної похідної (15аа) (85 мг, $5,6 \times 10^{-5}$ моль) при 0 °С додавали холодну трифтороцтову кислоту (17 мл). Розчин перемішували при даній температурі протягом 30 хвилин і трифтороцтову кислоту випарювали при зниженому тиску. Залишок знову розчиняли в безводному ДХМ (5 мл). Розчинник випарювали та залишок розтирали в диетиловому ефірі й отриману тверду речовину жовтого кольору відфільтровували та сушили у вакуумі (70 мг, 81 %). Результати випробувань: R_T 2,78 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1444 ($[\text{M}+2]^+$; 1).

Сполука 15bb (MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-2-(5-амінобутил)-5-бензил-37-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-(5-((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,11а-тетрагідро-пірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-ілокси)пентилокси)-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагідропірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат)

До малеїмідної похідної (15ab) (44 мг, $2,6 \times 10^{-5}$ моль) при 0 °C додавали холодну трифтороцтову кислоту (9 мл). Розчин перемішували при даній температурі протягом 30 хвилин і трифтороцтову кислоту випарювали при зниженому тиску. Залишок знову розчиняли в безводному ДХМ (5 мл). Розчинник випарювали та залишок розтирали в диетиловому ефірі й отриману тверду речовину жовтого кольору відфільтровували та сушили у вакуумі (40 мг, 91 %).

Результати випробувань: R_T 2,80 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1603 ($[M+2]^+$; 1).

Сполука 15d (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-5-ізопропіл-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-(5-((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,11а-тетрагідро-пірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-ілокси)пентилокси)-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагідропірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат)

До суспензії амінодипептиду (12с) (40,3 мг, $4,4 \times 10^{-5}$ моль, 1,0 екв.) та малеїмід-8-Рег-кислоти (28 мг, $4,8 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) додавали EEDQ (12 мг, $4,8 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.). Додавали безводний диметилацетамід (0,05 мл) із отриманням блідо-жовтого розчину, який перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску й залишок розтирали в диетиловому ефірі. Отриманий твердий продукт очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії. Результати випробувань: R_T 2,90 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1496 ($[M+H]^+$; 40).

Сполука 15e

До розчину амінодипептиду (12с) (32 мг, $3,5 \times 10^{-5}$ моль, 1,0 екв.) і складного ефіру малеїмід-dPeg®24-NHS (58 мг, $4,16 \times 10^{-5}$ моль, 1,2 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) додавали N, N-діізопропілдіетиламін (10,8 мкл, 8 мг, $7,6 \times 10^{-5}$ моль, 2,2 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 96 годин. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (15 мл) і промивали насиченим розчином $NaHCO_3$ (25 мл), сольовим розчином (25 мл), сушили ($MgSO_4$) й упарювали при зниженому тиску з одержанням блідо-жовтого склоподібного продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елювання: 100 % хлороформ – 91 % хлороформ/9 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді в'язкого жовтого продукту (17 мг, 22 %).

Сполука 16d

Пептид біотин-A20FMDV-Cys (59), який є високо селективним стосовно інтегрину $\alpha_v\beta_6$, синтез якого значно підвищений при багатьох ракових захворюваннях, був обраний для кон'югування з похідними сполук PBD-лінкер.

До розчину сполуки (15d) (6,91 мг, 4,62 мкмоль, 1,0 екв.) у суміші 1/1 ацетонітрил/вода (3 мл) додавали розчин пептиду (59) (11,3 мг, 4,35 мкмоль, 0,98 екв.) у суміші 1/1 ацетонітрил/вода (2 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 96 годин. Ацетонітрил випарювали при зниженому тиску, а воду видаляли ліофілізацією з отриманням білої піни. Після очищення за допомогою напівпрепаративної ВЕРХ з подальшою ліофілізацією отримували продукт у вигляді білої піни (3,8 мг, 21 %). Результати випробувань: МС (MaldiTOF) m/z (відносна інтенсивність) 3991,1 ($[M+H]^+$; 100).

Сполука 24a

Сполука 24a описана як Сполука 3 у WO 2004/043963.

Сполука 24b

До розчину ТЕМПО (730 мг, 4,67 ммоль, 0,07 екв.) та спирту 24a (25 г, 70,5 ммоль, 1екв.) у ДХМ (500 мл) при 0 °C додавали порціями твердий ТССА (18 г, 77,4 ммоль, 1,1 екв.). Спостерігали невелике нагрівання. Реакцію вважали завершеною через 30 хвилин за результатами ТШХ (етилацетат) і РХ/МС (2,38 хвилин (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 353,34 ($[M+H]^+$; 100)). Суспензію фільтрували через целіт і промивали ДХМ. Фільтрат промивали водним розчином бісульфіту натрію з наступним промиванням насиченим розчином $NaHCO_3$ (обережно, інтенсивне спінення), сольовим розчином (100 мл) й сушили ($MgSO_4$). Після фільтрування і випарювання у вакуумі отримували технічний продукт, який очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії (елювання: 20:80 об./об., n-гексан/ $EtOAc$) з отриманням кетону 24b у вигляді твердої речовини білого кольору (20 г, 80 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{26}=15^\circ$ (с=0,2, $CHCl_3$); МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 353,34 ($[M+H]^+$; 100); ІЧ (ATR, $CHCl_3$) 1748, 1642, 1518, 1425, 1335, 1222, 1176, 1063, 1032, 986, 857, 785, 756 cm^{-1} .

Сполука 25

До розчину кетону 24b (200 мг, 0,57 ммоль) у безводному ДХМ (10 мл) при інтенсивному перемішуванні при 45 °С (сухий лід/охолоджуюча баня з ацетонітрилом) у атмосфері азоту вводили однією порцією безводний 2,6-лютидин (0,395 мл, 365 мг, 3,40 ммоль). Безводний трифторметансульфоновий ангідрид, відібраний зі свіжовідкритої ампули (477 мкл, 800 мг, 2,83 ммоль), швидко вводили по краплях при постійній температурі -40 °С або нижче. Реакційну суміш залишали при перемішуванні при -45 °С протягом 1 години, після чого за результатами ТШХ спостерігали повну витрату початкового реагента (50/50 об./об., н-гексан/EtOAc). Холодну реакційну суміш негайно розбавляли ДХМ (20 мл) і при інтенсивному перемішуванні промивали водою (1 × 50 мл), 5 % розчином лимонної кислоти (1 × 50 мл), насиченим розчином NaHCO₃ (50 мл), сольовим розчином (30 мл) та сушили (MgSO₄). Після фільтрування і випарювання у вакуумі отримували технічний продукт, який очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії (градієнтне елюювання: від 60:40 (об./об. н-гексан/EtOAc до 50:50 об./об. н-гексан/EtOAc) з отриманням трифлату 25 у вигляді жовтої піни (151 мг, 55 %).

Жодна з відповідних 1,2-ненасичених сполук не були видні в спектрах ЯМР. Результати випробувань: $[\alpha]_D^{25} = -55^\circ$ (c=0,2, CHCl₃); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,75 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,25 (t, 1H, J=1,84 Гц), 5,19 (dd, 1H, J=5,05, 11,93 Гц), 4,03 (s, 6H), 3,90 (s, 3H), 3,50 (ddd, 1H, J=2,29, 11,96, 16,59 Гц), 3,02 (ddd, 1H, J=1,60, 5,05, 16,58 Гц); ІЧ (ATR, CHCl₃) 1748, 1653, 1577, 1522, 1415, 1335, 1276, 1205, 1130, 1061, 1024, 933, 908, 820, 783, 757, 663 см⁻¹; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 485,45 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 26

До розчину енолтрифлату 25 (9,029 г, 18,6 ммоль, 1 екв.), 4-метоксифенілборонової кислоти (3,67 г, 24,1 ммоль, 1,3 екв.), Na₂CO₃ (5,13 г, 48,3 ммоль, 2,6 екв.), EtOH (45 мл), толуолу (90 мл) та води (45 мл) при перемішуванні додавали Pd(PPh₃)₄ (860 мг, 744 мкмоль, 0,04 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні в атмосфері азоту протягом ночі, після чого за допомогою ТШХ спостерігали повне витрачання початкових реагентів (60/40 EtOAc/гексан) та РХ/МС (3,10 хвилин (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 443,38 ([M+H]⁺; 100)). Реакційну суміш розбавляли EtOAc (400 мл) та промивали H₂O (2 × 300 мл), сольовим розчином (200 мл), сушили (MgSO₄), фільтрували й упарювали при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою флеш-хроматографії (градієнтне елюювання: від 60:40 об./об. гексан/EtOAc до 40:60 об./об. гексан/EtOAc) отримували С2-арильну сполуку 26 у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору (7,0 г, 85 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{25} = -122^\circ$ (c=0,2, CHCl₃); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,78 (s, 1H), 7,30 (d, 2H, J=8,81 Гц), 6,95 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,83 (d, 2H, J=8,88 Гц), 5,03 (dd, 1H, J=11,71, 5,28 Гц), 3,95 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,48-3,43 (m, 1H), 2,99-2,93 (m, 1H), ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 170,7, 162,5, 158,4, 153,9, 149,1, 137,9, 126,3, 125,6, 125,3, 122,9, 122,3, 113,8, 110,03, 107,6, 59,7, 57,9, 56,5, 56,2, 55,1, 54,9, 52,2, 33,9, 20,7, 14,0; ІЧ (ATR, CHCl₃) 1736, 1624, 1575, 1516, 1424, 1326, 1253, 1178, 1069, 1031, 863, 820, 803, 786, 757, 653, 617 см⁻¹; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 443,38 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 27

До розчину складного ефіру 26 (6,28 г, 14,2 ммоль, 1 екв.) у безводному ТГФ (100 мл) і EtOH (120 мл) при перемішуванні порціями додавали LiBH₄ (464 мг, 21,3 ммоль, 1,5 екв.). Спостерігали невеликий розігрів, який супроводжувався інтенсивним піноутворенням, температуру підтримували в діапазоні між 15 °С і 25 °С за допомогою охолоджуючої бані (лід/вода). Реакційну суміш перемішували протягом 1 години, після чого за допомогою ТШХ (етилацетат) спостерігали повне витрачання початкового реагента. Реакційну суміш обережно розбавляли етилацетатом (500 мл) і надлишок боргідриду видаляли обробкою холодним водним розчином лимонної кислоти. Органічний шар промивали 1N водним розчином HCl (100 мл) з наступним промиванням насиченим водним розчином NaHCO₃ (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили над MgSO₄, фільтрували й упарювали при зниженому тиску при 35 °С з отриманням проміжної сполуки спирту (4,50 г, 10,8 ммоль, 76 % вихід проміжної сполуки), яку відразу перерозчиняли в безводному ДХМ (200 мл). Розчин охолоджували до 0 °С й додавали ТЕА (2,26 мл, 0,162 ммоль, 1,5 екв.) з наступним додаванням розчину ацетилхлориду (1 мл, 14,0 ммоль, 1,3 екв.) у безводному ДХМ (30 мл). Реакційну суміш залишали до нагрівання до кімнатної температури, реакція тривала протягом 1 години. Завершення реакції спостерігали за допомогою ТШХ (EtOAc). Розчин промивали 2N водним розчином лимонної кислоти (50 мл), насиченим водним розчином NaHCO₃ (50 мл), сольовим розчином (50 мл), сушили над MgSO₄, фільтрували й упарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 50/50 до 60/40 суміші EtOAc гексан) з отриманням 2,65 г (41 % після двох стадій) чистого продукту у вигляді твердої речовини

помаранчевого кольору. Результати випробувань: $[\alpha]^{24}_D = -130^\circ$ ($c=0,28$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,74 (s, 1H), 7,12 (d, 2H, $J=8,84$ Гц), 6,91 (br s, 1H), 6,80 (d, 2H, $J=8,88$ Гц), 6,15 (s, 1H), 5,04-5,00 (m, 1H), 4,61-4,42 (m, 2H), 4,01 (s, 6H), 3,78 (s, 3H), 3,35-3,25 (m, 1H), 2,85-2,79 (m, 1H), 2,06 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,1, 159,1, 149,5, 126,1, 126,0, 114,1, 107,2, 56,8, 56,6, 55,3, 33,5, 20,9; ІЧ (ATR, CHCl_3) 1731, 1643, 1623, 1577, 1517, 1421, 1333, 1278, 1248, 1222, 1183, 1076, 1059, 1032, 864, 821, 802, 787, 756, 644, 619 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 456,81 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 28

До розчину сполуки 27 (170 мг, 0,372 ммоль, 1 екв.) у етанолі (7,6 мл) та оцтової кислоти (1,97 мл) додавали цинковий пил (365 мг, 5,58 ммоль, 15 екв.). Суміш інтенсивно перемішували та кип'ятили зі зворотним холодильником. За ходом протікання реакції стежили за допомогою ТШХ (етилацетат) і РХ/МС (2,97 хвилин (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 427,57 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100)), за результатами даних випробувань реакція завершилася через 5 хвилин. Реакційну суміш охолоджували, фільтрували через целіт і промивали ДХМ (50 мл). Фільтрат промивали водою (3 \times 30 мл), насиченим розчином NaHCO_3 (2 \times 30 мл), сольовим розчином (30 мл), сушили над MgSO_4 , фільтрували й упарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 60/40 до 80/20 суміші EtOAc /гексан) з отриманням 140 мг (88 %) чистого продукту у вигляді білої піни. Результати випробувань: $[\alpha]^{24}_D = -108^\circ$ ($c=0,20$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,22 (d, 2H, $J=8,80$ Гц), 6,89 (br s, 1H), 6,86 (d, 2H, $J=8,82$ Гц), 6,80 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 5,02-4,96 (m, 1H), 4,50-4,40 (m, 4H), 3,89 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,81 (s, 1H), 3,30-3,25 (m, 1H), 2,85-2,79 (m, 1H), 2,06 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 194,6, 171,1, 171,0, 170,4, 164,0, 160,8, 155,1, 149,5, 146,2, 143,6, 130,5, 129,2, 125,8, 115,5, 114,1, 107,6, 105,4, 100,9, 63,5, 60,4, 56,9, 56,3, 37,4, 21,0, 20,6, 14,2; ІЧ (ATR, CHCl_3) 1733, 1589, 1512, 1396, 1209, 1176, 1113, 1031, 823, 791, 762 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 427,57 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 29

До свіжоприготованого розчину трифосгену (125 мг, 0,42 ммоль, 0,45 екв.) у безводному ТГФ (4 мл) при 0°C додавали по краплях розчин аміну 28 (400 мг, 0,93 ммоль, 1 екв.) і ТЕА (350 мкл, 2,5 ммоль, 2,6 екв.) у безводному ТГФ. Суспензію білого кольору залишали при перемішуванні при 0°C протягом 10 хвилин. Швидко додавали розчин спирту 7b (Alloc-Phe-Lys (Вос)-РАВОН, 546 мг, 0,93 ммоль, 1 екв.) і ТЕА (350 мкл, 2,5 ммоль, 2,6 екв.) у безводному ТГФ (40 мл). Суспензію білого кольору залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, потім гріли при 65°C протягом 2 годин, потім залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом ночі. Білу сіль ТЕА видаляли фільтруванням через бавовняну вату. Фільтрат концентрували та очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт, 1 % MeOH в хлороформі до 3 % MeOH в хлороформі) з отриманням 700 мг цільового карбамату (72 %). Результати випробувань: $[\alpha]^{24}_D = -30,2^\circ$ ($c=0,18$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,54 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,45 (d, 2H, $J=8,43$ Гц), 7,23 (d, 2H, $J=8,52$ Гц), 7,16-7,06 (m, 7H), 6,78-6,72 (m, 4H), 6,46 (d, 1H, $J=7,84$ Гц), 5,82-5,73 (m, 1H), 5,30 (s, 1H), 5,19-5,06 (m, 2H), 5,03 (d, 1H, $J=1,29$ Гц), 4,93-4,87 (m, 1H), 4,63 (m, 1H), 4,47-4,28 (m, 6H), 3,87 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,72 (s, 1H), 3,16-3,09 (m, 1H), 3,07-2,95 (m, 4H), 2,72-2,67 (m, 1H), 1,95-1,83 (m, 1H), 1,60-1,51 (m, 1H), 1,43-1,39 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 1,28-1,19 (m, 2H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,5, 171,1, 169,2, 165,8, 159,1, 156,2, 153,8, 151,6, 144,1, 137,8, 135,8, 132,2, 131,9, 129,1, 129,0, 128,9, 127,3, 126,2, 125,9, 123,5, 123,4, 119,9, 118,2, 114,2, 111,3, 66,5, 66,2, 64,0, 56,5, 56,1, 55,3, 53,8, 33,1, 30,9, 29,4, 28,4, 22,6, 20,8; ІЧ (ATR, CHCl_3) 1697, 1652, 1604, 1516, 1456, 1418, 1245, 1225, 1177, 1115, 1033, 824, 750 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1036,25 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 30

До розчину ацетатного складного ефіру 29 (920 мг, 0,89 ммоль, 1 екв.) у метанолі (20 мл) додавали водний розчин (3,3 мл) карбонату калію (600 мг, 4,34 ммоль, 5 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 50 хвилин, після чого за допомогою ТШХ (хлороформ/метанол, 90/10) робили висновок про завершення реакції. Суміш обробляли водою (150 мл) і дихлорметаном (200 мл). Органічну фазу промивали 1N лимонною кислотою (50 мл) з наступним промиванням сольовим розчином (50 мл), сушили над MgSO_4 , фільтрували й упарювали при зниженому тиску з одержанням цільового спирту 30 (700 мг, 79 %). Результати випробувань: $[\alpha]^{24}_D = -61^\circ$ ($c=0,18$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,60 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,42 (d, 2H, $J=8,38$ Гц), 7,24-7,18 (m, 2H), 7,1-7,05 (m, 7H), 6,83-6,66 (m, 5H), 5,81-5,71 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 5,18-5,08 (m, 2H), 4,99 (s, 2H), 4,75-4,69 (m, 2H), 4,48-4,25 (m, 5H), 3,86 (s, 3H), 3,82-3,76 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,19-3,12 (m, 1H), 3,05-2,92 (m, 4H), 2,62-2,57 (m, 1H), 1,85-1,75 (m, 2H), 1,59-1,51 (m, 1H), 1,38-1,34 (m, 11H), 1,28-1,18 (m, 2H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,7, 169,5, 167,0, 159,2, 156,3, 153,9, 151,6, 144,4, 137,8, 135,9,

132,3, 131,9, 129,2, 128,8, 127,2, 126,0, 124,5, 123,3, 120,1, 118,1, 114,2, 111,3, 66,6, 66,1, 61,6, 56,5, 56,1, 55,3, 53,8, 39,9, 33,6, 31,1, 29,4, 28,4, 22,6; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 994,7 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 31

5 Спирт 30 (500 мг, 0,503 ммоль, 1 екв.) розчиняли в безводному ДХМ (50 мл) при кімнатній температурі. До суміші додавали твердий перйодат Деса-Мартіна (300 мг, 0,707 ммоль, 1,4 екв.) з наступним додаванням додаткових 75 мг через 1 годину, після чого додавали додатково 57 мг через 2 години і 31 мг через 5 годин, при цьому загальна маса перйодату Деса-Мартіна склала 463 мг (1,09 ммоль, 2,17 екв.). За реакцією безперервно стежили за допомогою ТШХ
10 (хлороформ/метанол, 95/5, два етапи елюювання). Через 6,5 годин реакційну суміш обробляли ДХМ і насиченим водним розчином NaHSO₃. Органічний шар потім промивали насиченим водним розчином NaHSO₃ з наступним промиванням сольовим розчином, сушили над MgSO₄, фільтрували й упарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 0/100 до 2/98 суміші метанол/хлороформ) з отриманням 259 мг
15 (52 %) чистого продукту 31. Результати випробувань: [α]_D²⁴ = +106° (c=0,16, CHCl₃); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,68 (s, 1H), 7,54-7,46 (m, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,31-7,16 (m, 8H), 6,89 (d, 2H, J=8,70 Гц), 6,75 (bs, 1H), 6,61 (s, 1H), 5,89-5,84 (m, 2H), 5,45 (d, 1H, J=4,80 Гц), 5,28-5,08 (m, 3H), 4,84-4,76 (m, 2H), 4,58-4,47 (m, 4H), 4,28 (bs, 1H), 4,02-3,95 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,74 (s, 2H), 3,41-3,32 (m, 1H), 3,16-3,02 (m, 5H), 2,03-1,83 (m, 1H), 1,68-1,61 (m, 1H), 1,55-1,39 (m, 11H),
20 1,36-1,28 (m, 2H). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 171,7, 169,5, 163,2, 159,1, 156,3, 151,1, 148,6, 138,0, 135,9, 132,3, 129,2, 128,8, 127,2, 126,3, 126,2, 121,7, 120,0, 118,2, 114,2, 112,7, 110,7, 86,2, 79,3, 67,6, 66,2, 59,5, 56,4, 56,15, 56,1, 55,3, 53,8, 39,9, 38,1, 35,1, 31,0, 29,4, 28,4, 22,7; ІЧ (ATR, CHCl₃) 3313, 2935, 2356, 1691, 1603, 1512, 1431, 1253, 1177, 1119, 1033, 824, 750, 698 см⁻¹; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 992,41 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 32

25 До свіжоприготованого розчину початкової сполуки 31 (346 мг, 0,349 ммоль, 1 екв.) і піролідину (43,3 мкл, 0,523 ммоль, 1,5 екв.) у безводному ДХМ (10 мл) в інертній атмосфері при кімнатній температурі додавали твердий Pd(PPh₃)₄ (8 мг, 6,9 мкмоль, 0,02 екв.). Реакція завершувалася через 45 хвилин, як показано за допомогою ТШХ (90/10 об./об.
30 хлороформ/метанол) та РХ/МС (2,93 хвилин (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 908,09 ([M+H]⁺; 100)). Летучі сполуки видаляли упарюванням при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 2/98 до 5/95 метанол/хлороформ) з отриманням 298 мг (94 %) чистого продукту 32. Результати випробувань: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,87 (s, 1H), 7,86 (d, 1H, J=8,06 Гц), 7,51 (d, 2H, J=8,42 Гц), 7,36-7,11 (m, 9H), 6,89 (d, 2H, J=8,73 Гц), 6,58 (bs, 1H), 5,85 (d, 1H, J=9,47 Гц), 5,32 (m, 1H), 4,83 (d, 1H, J=11,68 Гц), 4,65 (m, 1H), 4,47 (q, 1H, J=6,14 Гц), 4,03-3,97 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,74-3,69 (m, 4H), 3,39-3,33 (m, 1H), 3,26 (dd, 1H, J=13,73 Гц, J=4,00 Гц), 3,16-3,03 (m, 3H), 3,26 (dd, 1H, J=8,91 Гц, J=13,74 Гц), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,78-1,49 (m, 3H), 1,48-1,42 (m, 9H), 1,42-1,24 (m, 2H). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 175,45, 163,2, 159,1, 156,2, 148,6, 137,3, 129,3, 128,8, 127,0, 126,2, 121,7, 119,8, 114,2,
40 112,6, 56,2, 55,3, 40,7, 35,1, 30,5, 28,4, 22,8; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 908,09 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 33

45 До розчину аміну 32 (199 мг, 0,219 ммоль, 1 екв.) і малеїмідогексанової кислоти (57 мг, 0,269 ммоль, 1,23 екв.) у суміші ДХМ (6 мл) і метанолу (3 мл) додавали твердий EEDQ (108 мг, 0,436 ммоль, 2 екв.). Розчин залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 24 годин. Про завершення реакції судили за допомогою РХ/МС (3,45 хвилин (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 1101,78 ([M+H]⁺; 100)). Летучі сполуки видаляли упарюванням при зниженому тиску. Залишок обробляли ДХМ та насиченим водним розчином NaHCO₃, промивали сольовим розчином, сушили над MgSO₄, фільтрували та упарювали при зниженому тиску. Залишок
50 очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 1/99 до 2,5/97,5 суміші метанол/хлороформ) з отриманням 165 мг (68 %) чистого продукту 33. Результати випробувань: [α]_D²⁴ = +94° (c=0,09, CHCl₃); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,62 (s, 1H), 7,46-7,39 (m, 2H), 7,27 (s, 1H), 7,22-7,06 (m, 9H), 6,79 (d, 2H, J=8,65 Гц), 6,75 (bs, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 6,28 (s, 1H), 5,77 (bs, 1H), 5,21 (s, 1H), 4,75-4,60 (m, 2H), 4,40 (q, 1H, J=5,54 Гц), 3,93-3,86 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,65 (s, 2H), 3,36 (t, 2H, J=7,16 Гц), 3,30-3,23 (m, 1H), 3,08-2,90 (m, 5H), 2,09 (t, 2H, J=7,14 Гц), 1,93-1,75 (m, 1H), 1,62-1,31 (m, 17H), 1,30-1,04 (m, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 173,5, 170,9, 170,3, 169,6, 163,2, 159,1, 156,3, 151,1, 148,6, 136,1, 134,0, 129,1, 128,7, 127,2, 126,3, 126,2, 124,9, 123,3, 121,7, 120,0, 114,2, 112,7, 110,7, 86,1, 79,3, 67,6, 59,5, 56,2, 56,1, 55,3, 54,6, 53,9, 53,4, 37,8, 37,5, 36,7, 35,2, 31,0, 29,4, 28,5, 28,2, 26,2, 24,8, 22,7; МС (ES⁺) m/z
60 (відносна інтенсивність) 1101,78 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 34

До охолодженого (-20 °C) зразка сполуки 33 (75 мг, 0,068 ммоль, 1 екв.) додавали охолоджений розчин 10 % ТФО в ДХМ (12 мл). За реакцією стежили за допомогою РХ/МС (2,87 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1001,13 ([M+H]⁺; 100)). При температурі до -10 °C протікання побічних реакцій не спостерігалось. Реакція завершувалася через 4 години. Реакційну суміш виливали в деіонізовану воду (50 мл) і ліофілізували протягом ночі (баня з рідким азотом, дозволяли випарюватися без додавання) з отриманням чистої солі ТФО 34 (75 мг, 99 %). Результати випробувань: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,05 (s, 1H), 7,87-7,62 (m, 4H), 7,35 (m, 2H), 7,24 (s, 1H), 7,16-7,11 (m, 2H), 7,10-6,96 (m, 8H), 6,92 (s, 1H), 6,82-6,66 (m, 3H), 6,63-6,42 (m, 3H), 5,75 (d, 1H, J=9,54 Гц), 5,15-5,03 (m, 1H), 4,77-4,74 (m, 1H), 4,68-4,56 (m, 1H), 4,39 (s, 1H), 3,97-3,84 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,65 (s, 2H), 3,33-3,21 (m, 3H), 3,04-2,69 (m, 5H), 2,04 (m, 2H), 1,979-1,64 (m, 1H), 1,63-1,45 (m, 3H), 1,44-1,12 (m, 6H), 1,07-0,95 (m, 2H). МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 1001,13 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 35

До розчину NHS-PEG₄-малеїміду (Thermo Scientific, 61,6 мг, 0,120 ммоль, 1,1 екв.) і TEA (18,2 мкл, 0,130 ммоль, 1,2 екв.) у суміші безводного ДХМ (5 мл) і ДМФА (1 мл) додавали амін 32 (99 мг, 0,109 ммоль, 1 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом ночі, після чого спостерігали майже повне завершення реакції за допомогою РХ/МС (3,27 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1307,55 ([M+H]⁺; 100)). Летучі речовини видаляли упарюванням при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 3/97 до 5/95 метанол/хлороформ) з отриманням 71 мг (50 %) чистого продукту 35. Результати випробувань: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,58 (s, 1H), 7,50 (d, 2H, J=8,47 Гц), 7,28 (s, 1H), 7,25-7,20 (m, 2H), 7,18-7,01 (m, 9H), 6,89 (d, 1H, J=7,58 Гц), 6,79 (d, 2H, J=8,68 Гц), 6,59 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,77 (d, 1H, J=6,42 Гц), 5,25 (d, 1H, J=11,43 Гц), 4,83-4,64 (m, 2H), 4,63-4,49 (m, 1H), 4,43-4,38 (m, 1H), 4,18 (s, 1H), 3,96-3,85 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,76-3,56 (m, 9H), 3,57-3,34 (m, 15H), 3,34-3,20 (m, 3H), 3,15 (dd, 1H, J=14,22 Гц, J=5,60 Гц), 3,07-2,89 (m, 4H), 2,48-2,29 (m, 4H), 1,97-1,90 (m, 1H), 1,61-1,39 (m, 3H), 1,35 (s, 9H), 1,29-1,12 (m, 4H). МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 1307,55 ([M+H]⁺; 100).

Сполука 36

До охолодженого (-20 °C) зразка сполуки 35 (70 мг, 0,054 ммоль, 1 екв.) додавали охолоджений розчин 10 % ТФО в ДХМ (10 мл). За реакцією стежили за допомогою РХ/МС (2,77 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1206,94 ([M+H]⁺; 100)). Реакція завершувалася через 18 годин при -25 °C. Реакційну суміш виливали в деіонізовану воду (50 мл) та ліофілізували протягом ночі (баня з рідким азотом, дозволяли випарюватися без додавання) з отриманням чистої солі ТФО сполуки 36 (75 мг, 99 %).

Сполука 37

До розчину циклічного тіопептиду c(RGDfC) (5 мг, 8,6 мкмоль, 1 екв., з джерела pepnet.com) у суміші метанолу (2 мл) і води (1 мл) додавали розчин сполуки 33 (9,5 мг, 8,6 мкмоль, 1 екв.) у метанолі (1,5 мл). Реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом 1 години. Отриманий осад відфільтровували і промивали сумішшю метанолу і води (0,6 мл/0,4 мл) та сушили за допомогою вакуум-відсосу з отриманням 8 мг (55 %) чистого продукту за даними РХ/МС (3,03 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1681,19 ([M+H]⁺; 10), 790,85 (100)).

Сполука 38

Сполуку 37 (7 мг) обробляли 10 % ТФО в ДХМ (1 мл) при 0 °C (льодяна баня) протягом 2 годин. Спостерігали завершення реакції за допомогою РХ/МС (2,70 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 791,44 ([M+2H]/2⁺; 100)). Реакційну суміш виливали в деіонізовану воду (10 мл) і ліофілізували протягом ночі (на бані з рідким азотом, дозволяли випарюватися без додавання) з отриманням чистої солі ТФО сполуки 38 (7 мг, кількісний вихід).

Сполука 39a

Сполука 39a та її синтез описані у WO 00/012508 і WO 2006/111759.

Сполука 39b

Спосіб I: До розчину нітрокислоти 39a (1,0 г, 2,15 ммоль) і оксалілхлориду (0,95 мл, 1,36 г, 10,7 ммоль) у безводному ТГФ (20 мл) при перемішуванні додавали каталітичну кількість ДМФА (2 краплі) (бурхливе виділення газу!). Реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом 16 годин при кімнатній температурі й розчинник видаляли випарюванням у вакуумі. Отриманий залишок перерозчиняли у безводному ТГФ (20 мл), а розчин хлорангідриду при перемішуванні в атмосфері азоту при 30 °C (сухий лід/етиленгліколь) по краплях додавали до розчину гідрохлориду (2S, 4R)-метил-4-гідроксипіролідін-2-карбоксилату (859 мг, 4,73 ммоль) і TEA (6,6 мл, 4,79 г, 47,3 ммоль) у ТГФ (10 мл). Реакційну суміш залишали до нагрівання до кімнатної температури і перемішували протягом ще 3 годин, після чого за допомогою ТШХ (95:5 об./об.

CHCl₃/MeOH) та PX/MC (2,45 хвилин (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 721 ([M+H]⁺; 20)) спостерігали утворення продукту. Надлишок ТГФ видаляли за допомогою ротаційного випарника і отриманий залишок розчиняли в ДХМ (50 мл). Органічний шар промивали 1N розчином HCl (2 × 15 мл), насиченим розчином NaHCO₃ (2 × 15 мл), H₂O (20 мл), сольовим розчином (30 мл) та сушили (MgSO₄). Після фільтрування й упарювання отримували технічний продукт у вигляді темної олії. Після очищення за допомогою флеш-хроматографії (градієнтне елювання: 100 % CHCl₃ – 96:4 об./об. CHCl₃/MeOH) виділяли чистий амід 39b у вигляді помаранчевого склоподібного продукту (840 мг, 54 %).

Спосіб II: До суспензії нітрокислоти 39a (17,3 г, 37,1 ммоль) і ДМФА (2 мл) у безводному ДХМ (200 мл) при перемішуванні додавали оксалілхлорид (9,75 мл, 14,2 г, 111 ммоль). Після бурхливого спочатку виділення газу реакційна суспензія гомогенізувалася, після чого суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 16 годин. Перетворення хлорангідриду підтверджували шляхом обробки зразка реакційної суміші MeOH і спостереження отриманого складного біс-метилового ефіру за допомогою PX/MC. Основну порцію розчинника видаляли упарюванням у вакуумі, отриманий концентрований розчин перерозчиняли в мінімальній кількості безводного ДХМ та розтирали в діетиловому ефірі. Отриманий жовтий осад відфільтровували, промивали холодним діетиловим ефіром та сушили 1 годину у вакуумному шафі при 40 °C. Твердий хлорангідрид додавали порціями при перемішуванні протягом 25 хвилин при -40 °C (сухий лід/CH₃CN) до суспензії гідрохлориду (2S, 4R)-метил-4-гідроксипіролідін-2-карбоксилату (15,2 г, 84,0 ммоль) і TEA (25,7 мл, 18,7 г, 185 ммоль) у ДХМ (150 мл). За даними PX/MC (2,47 хвилин (IEP⁺) m/z (відносна інтенсивність) 721 ([M+H]⁺; 100)) реакція завершувалася швидко. Суміш розбавляли ДХМ (150 мл) та промивали 1N розчином HCl (300 мл), насиченим розчином NaHCO₃ (300 мл), сольовим розчином (300 мл), фільтрували (у фазовому роздільнику) й розчинник упарювали у вакуумі з одержанням чистого продукту 39b у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору (21,8 г, 82 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{22} = -46,1^\circ$ (c=0,47, CHCl₃); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) (ротамери) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, J=11,1 Гц), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) (ротамери) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; ІЧ (ATR, CHCl₃) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 см⁻¹; MC (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 721 [M+H]⁺; 47), 388 (80); MCBP [M+H]⁺ теоретично: C₃₁H₃₆N₄O₁₆ m/z 721,2199, виявлено: (ES⁺) m/z 721,2227.

Сполука 39c

До розчину TEMPO (1 г, 6,4 ммоль, 0. 1 екв.) і біс-спирту 18 (45 г, 62,5 ммоль, 1 екв.) у нормальному ДХМ (500 мл) при 0 °C додавали порціями твердий ТССА (32 г, 137 ммоль, 2,2 екв.). Спостерігали слабкий розігрів реакційної суміші. За допомогою ТШХ (етилацетат) і PX/MC (2,95 хвилин (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 718,10 ([M+H]⁺; 100)) судили про завершення реакції через 30 хвилин. Суспензію фільтрували через целіт і промивали ДХМ. Фільтрат промивали водним розчином бісульфіту натрію з наступним промиванням насиченим розчином NaHCO₃ (обережно, інтенсивне спінення), сольовим розчином (200 мл) і сушили (MgSO₄). Після фільтрування та випарювання у вакуумі отримували технічний продукт, який очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії (елювання: 20:80 об./об. н-гексан/EtOAc) з отриманням кетону 39c у вигляді твердої речовини білого кольору (28,23 г, 63 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{21} = +18^\circ$ (c=0,2, CHCl₃); MC (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 718,10 ([M+H]⁺; 100); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) суміш ротамерів δ 7,70 (m, 2H), 6,79 (m, 2H), 5,27 (m, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,30 (m, 4H), 3,93 (m, 6H), 3,81 (s, 3H), 3,75 (m, 1H), 3,63 (s, 2H), 3,58 (m, 1H), 3,09-2,89 (m, 2H), 2,74-2,53 (m, 2H), 2,40 (p, 2H, J=5,73 Гц); ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) суміш ротамерів δ 206,5, 206,4, 206,0, 205,9, 171,2, 171,1, 170,6, 167,0, 166,7, 155,0, 154,5, 148,8, 137,7, 137,3, 126,4, 125,4, 109,8, 109,1, 108,6, 108,4, 108,4, 65,7, 65,6, 65,5, 60,4, 57,9, 56,7, 56,7, 55,1, 53,6, 52,9, 52,9, 51,6, 41,2, 40,1, 28,7, 28,6, 21,0, 14,1; ІЧ (ATR, CHCl₃) 1764, 1650, 1578, 1518, 1415, 1333, 1274, 1217, 1060, 870, 824 759 см⁻¹.

Сполука 40

Безводний 2,6-лутидин (4,26 мл, 3,92 г, 36,6 ммоль) вводили однією порцією до розчину біс-кетону 39c (4,23 г, 5,90 ммоль), що інтенсивно перемішували, у безводному ДХМ (100 мл) при -45 °C (охолоджуючій бані сухий лід/ацетонітрil) у атмосфері азоту. Швидко вводили по краплях безводний трифторметансульфоновий ангідрид, відібраний зі свіжовідкритої ампули (5,96 мл, 10 г, 35,4 ммоль) при постійній температурі -40 °C або нижче. Реакційну суміш залишали при перемішуванні при -45 °C протягом 1 години, після чого за допомогою ТШХ (50/50 об./об. н-гексан/EtOAc) спостерігали повне витрачання початкових реагентів. Холодну реакційну суміш відразу розбавляли ДХМ (200 мл) та промивали, інтенсивно перемішуючи, водою (1 × 300 мл),

5 % розчином лимонної кислоти (1 × 200 мл), насиченим розчином NaHCO_3 (200 мл), сольовим розчином (150 мл) і сушили (MgSO_4). Після фільтрування та упарювання у вакуумі отримували технічний продукт, який очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії (градієнтне елюювання: від 70:30 об./об. н-гексан/ EtOAc до 40:60 об./об. н-гексан/ EtOAc) з отриманням біс-трифлату 40 у вигляді жовтої піни (1,32 г, 23 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{25} = -68^\circ$ ($c=0,2$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,73 (s, 2H), 6,85 (s, 2H), 6,20 (t, 2H, $J=1,81$ Гц), 5,13 (dd, 2H, $J=5,05$, 11,93 Гц), 4,33 (t, 4H, $J=5,91$ Гц), 3,95 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,43 (ddd, 2H, $J=2,28$, 11,92, 16,59 Гц), 2,96 (ddd, 2H, $J=1,60$, 5,05, 16,58 Гц), 2,44 (p, 2H, $J=5,79$ Гц); ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 169,4, 164,1, 154,7, 149,2, 138,0, 135,2, 124,4, 121,1, 120,0, 116,8, 110,0, 108,4, 65,7, 65,6, 57,0, 56,8, 53,1, 33,3, 28,6; ІЧ (ATR, CHCl_3) 1749, 1654, 1576, 1522, 1418, 1337, 1277, 1207, 1131, 1061, 1023, 910, 821, 757 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 981,86 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 41

До розчину біс-енолтрифлату 40 (7 г, 7,13 ммоль, 1 екв.), 4-фторфенілборонової кислоти (2,6 г, 18,5 ммоль, 2,6 екв.), Na_2CO_3 (3,93 г, 37,0 ммоль, 5,2 екв.), EtOH (25 мл), толуолу (50 мл) і води (25 мл) при перемішуванні додавали $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (660 мг, 571 мкмоль, 0,08 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні в атмосфері азоту протягом ночі, після чого спостерігали повне витрачання початкових реагентів за допомогою ТШХ (60/40 EtOAc /гексан) і РХ/МС (3,68 хв (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 873,90 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100)). Реакційну суміш розбавляли EtOAc (300 мл) та промивали H_2O (2 × 200 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO_4), фільтрували й упарювали при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою флеш-хроматографії (градієнтне елюювання: від 50:50 об./об. суміші гексан/ EtOAc до 80:20 об./об. суміші гексан/ EtOAc) отримували біс-С2-арильну сполуку 41 у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору (5,46 г, 88 %). Результати випробувань: $[\alpha]_D^{22} = -107^\circ$ ($c=0,2$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,76 (s, 2H), 7,14-7,04 (m, 4H), 6,97-6,87 (m, 6H), 6,31 (s, 2H), 5,18 (dd, 2H, $J=11,68$, 5,03 Гц), 4,36 (t, 4H, $J=5,87$ Гц), 3,97 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,53-3,39 (m, 2H), 3,00 (ddd, 2H, $J=1,22$, 5,01, 16,28 Гц), 2,46 (p, 2H, $J=5,98$ Гц); ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,0, 163,3, 148,9, 138,0, 128,1, 126,3, 126,2, 125,8, 123,1, 122,6, 115,7, 115,5, 110,3, 108,5, 65,7, 58,3, 56,8, 34,7, 28,7; ІЧ (ATR, CHCl_3) 1738, 1650, 1578, 1512, 1416, 1333, 1275, 1212, 1064, 1023, 869, 808, 758, 654, 613 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 873,90 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100)).

Сполука 42

До розчину складного ефіру 41 (5,30 г, 6,07 ммоль, 1 екв.) у безводному ТГФ (100 мл) при перемішуванні при 0°C додавали однією порцією LiBH_4 (132 мг, 21,3 ммоль, 3 екв.). Реакційну суміш залишали до досягнення кімнатної температури та перемішували протягом 1 години, після чого безпосередньо спостерігали повне перетворення початкових реагентів за допомогою РХ/МС (3,42 хвилини (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 818,35 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100)). Реакційну суміш обережно розбавляли етилацетатом (500 мл) і надлишок боргідриду нейтралізовували за допомогою холодного водного розчину лимонної кислоти. Органічний шар промивали 1N водним розчином HCl (100 мл) з наступним промиванням насиченим водним розчином NaHCO_3 (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили над MgSO_4 , фільтрували й упарювали при зниженому тиску при 35°C з отриманням проміжного спирту, який перерозчиняли в безводному ДХМ (200 мл). Розчин охолоджували до 0°C й додавали імідазол (3,97 г, 58,0 ммоль, 9,6 екв.) з наступним додаванням TBDMS-Cl (4,390 г, 29,1 ммоль, 4,8 екв.). Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури та проводили реакцію протягом 2 годин. Завершення реакції спостерігали за допомогою ТШХ (EtOAc /гексан, 50/50) та РХ/МС (4,23 хв (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1045,99 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100)). Розчин промивали 2N водним розчином лимонної кислоти (50 мл), насиченим водним розчином NaHCO_3 (50 мл), сольовим розчином (50 мл), сушили над MgSO_4 , фільтрували й упарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 80/20 до 60/40 суміші гексан/ EtOAc) з отриманням 2,45 г (38,6 % після двох стадій) чистого продукту у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору. Результати випробувань: $[\alpha]_D^{22} = -123^\circ$ ($c=0,18$, CHCl_3); ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,76 (s, 2H), 7,17-7,06 (m, 4H), 6,96-6,87 (m, 4H), 6,81 (s, 2H), 6,17 (s, 2H), 4,84-4,72 (m, 2H), 4,35 (t, 4H, $J=5,87$ Гц), 3,93 (s, 6H), 3,25-3,07 (m, 2H), 3,03-2,91 (m, 2H), 2,45 (p, 2H, $J=5,92$ Гц), 0,84 (s, 18H), 0,07 (s, 12H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 163,2, 160,7, 154,5, 148,6, 137,9, 130,1, 130,0, 126,7, 126,3, 126,2, 124,3, 123,0, 115,6, 115,4, 110,0, 108,5, 65,7, 60,4, 59,2, 56,7, 33,2, 28,7, 25,8, 25,7, 21,0, 18,2, 14,2, -5,3; ІЧ (ATR, CHCl_3) 2953, 1742, 1650, 1576, 1512, 1417, 1334, 1274, 1214, 1063, 1023, 869, 808, 759, 654, 612 cm^{-1} ; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1045,99 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 43

До суспензії біс-нітросполуки 42 (2,35 г, 2,25 ммоль, 1 екв.) і цинкового пилу (8,82 г, 0,135 ммоль, 60 екв.) у етанолі (35 мл) додавали розчин мурашиної кислоти в етанолі (5 % за

об'ємом, 100 мл). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 25 хвилин, після чого за допомогою ТШХ (метанол/хлороформ, 2/98) та РХ/МС (4,23 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 986,3 ($[M+H]^+$; 10), 493,9 ($[(M+2H)/2]^+$; 100)) виявляли завершення реакції. Суспензію фільтрували й фільтрат обробляли етилацетатом (400 мл) та насиченим водним розчином $NaHCO_3$ (200 мл). Органічний шар промивали сольовим розчином (100 мл), сушили над $MgSO_4$, фільтрували й упарювали при зниженому тиску з отриманням чистого біс-аміну (2,20 г, 98 %), який використовували на наступному етапі без додаткового очищення.

Сполука 44

До розчину біс-анілінової сполуки 43 (2,15 г, 2,18 ммоль, 1 екв.) та піридину (0,335 мл, 4,14 ммоль, 1,9 екв.) у безводному ДХМ (250 мл) при $-78^\circ C$ додавали по краплях розчин алілхлороформіату (0,209 мл, 1,97 ммоль, 0,9 екв.) у безводному ДХМ (50 мл). Реакційну суміш залишали при перемішуванні при $-78^\circ C$ протягом 2 годин і нагрівали до кімнатної температури. Розчин промивали насиченим водним розчином сульфату міді (2×50 мл), водою (250 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили над $MgSO_4$, фільтрували й упарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 70/30 до 30/70 суміші гексан/ $EtOAc$) з отриманням 668 мг (26,5 %) Алос сполуки, яка містить дві захисні групи, як показано за допомогою РХ/МС (4,45 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1154,32 ($[M+H]^+$; 100)), і 800 мг цільової Алос сполуки, яка містить одну захисну групу з незначною кількістю домішок (4,32 хвилин (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1070,58 ($[M+H]^+$; 100)). Дану сполуку додатково очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 40/60 до 20/80 суміші гексан/діетиловий ефір) з отриманням 700 мг (30 %) цільової чистої сполуки, яка містить одну захисну групу Алос. Результати випробувань: $[\alpha]^{22}_D = -41^\circ$ ($c=0,16$, $CHCl_3$); 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,72 (bs, 1H), 7,88 (s, 2H), 7,25-7,18 (m, 4H), 7,02-6,93 (m, 4H), 6,93-6,83 (m, 3H), 6,80 (s, 1H), 6,36 (s, 1H), 6,00-5,84 (m, 1H), 5,32 (dd, 1H, $J=1,37$, $J=17,21$ Гц), 5,21 (dd, 1H, $J=0,90$, $J=10,40$ Гц), 4,85-4,71 (m, 2H), 4,60 (dd, 2H, $J=1,02$, $J=5,62$ Гц), 4,46 (s, 2H), 4,31 (t, 2H, $J=5,96$ Гц), 4,25 (t, 2H, $J=6,31$ Гц), 3,98 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,19-3,05 (m, 2H), 3,05-2,93 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, $J=6,16$ Гц), 0,84 (m, 18H), 0,05 (m, 12H); ІЧ (ATR, $CHCl_3$) 2952, 2359, 1732, 1652, 1601, 1507, 1472, 1406, 1225, 1119, 836, 777, 668 cm^{-1} ; МС (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1070,58 ($[M+H]^+$; 100).

Сполука 45

До свіжоприготованого розчину трифосгену (81 мг, 0,273 ммоль, 0,45 екв.) у безводному ТГФ (4 мл) при $0^\circ C$ додавали по краплях розчин аміну 44 (650 мг, 0,607 ммоль, 1 екв.) та ТЕА (220 мкл, 1,58 ммоль, 2,6 екв.) у безводному ТГФ. Суспензію білого кольору залишали при перемішуванні при $0^\circ C$ протягом 10 хвилин. Швидко додавали розчин спирту (Алос-Val-Ala-РАВОН, 229 мг, 0,607 ммоль, 1 екв.) та ТЕА (220 мкл, 1,58 ммоль, 2,6 екв.) у безводному ТГФ (30 мл). Суспензію білого кольору залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, потім гріли при $65^\circ C$ протягом 2 годин і потім залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом ночі. Білу сіль ТЕА видаляли за допомогою фільтрування через бавовняну вату. Фільтрат концентрували та очищали за допомогою флеш-хроматографії (градієнт від 0 % $MeOH$ у $CHCl_3$ до 3 % $MeOH$ у $CHCl_3$) з отриманням 220 мг цільового карбамату (25 %). Результати випробувань: $[\alpha]^{24}_D = -46,1^\circ$ ($c=0,13$, $CHCl_3$); 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,70 (bs, 2H), 8,46 (s, 1H), 7,83 (s, 2H), 7,50 (m, 2H), 7,31 (d, 2H, $J=8,50$ Гц), 7,25-7,15 (m, 4H), 7,03-6,93 (m, 4H), 6,92-6,77 (m, 4H), 6,51 (d, 1H, $J=7,48$ Гц), 5,99-5,81 (m, 1H), 5,38-5,15 (m, 5H), 5,13-5,03 (m, 2H), 4,77 (bs, 2H), 4,66-4,53 (m, 5H), 4,38-4,22 (m, 4H), 4,08-3,94 (m, 3H), 3,93-3,81 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,20-3,05 (m, 2H), 3,05-2,94 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, $J=5,95$ Гц), 2,22-2,08 (m, 1H), 1,45 (d, 3H, $J=7,03$ Гц), 0,94 (dd, 6H, $J=6,81$, $J=14,78$ Гц), 0,84 (m, 18H), 0,14-0,02 (m, 12H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 171,7, 169,8, 165,9, 163,1, 153,6, 151,0, 144,3, 137,8, 132,4, 132,3, 132,0, 130,2, 129,2, 126,2, 126,1, 125,3, 123,3, 123,2, 119,8, 118,2, 118,0, 115,7, 115,5, 112,0, 106,0, 66,5, 66,2, 65,8, 65,4, 62,5, 60,4, 59,5, 56,6, 49,6, 30,8, 28,9, 25,7, 19,2, 18,2, 18,1, 17,7, 17,3, 14,2, -5,4; ІЧ (ATR, $CHCl_3$) 2950, 2356, 1725, 1691, 1602, 1512, 1408, 1201, 1109, 1023, 832, 774, 668 cm^{-1} ; МС (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 1473,43 ($[M+H]^+$; 100).

Сполука І2

1-бензил-19-(2,5-диоксопіролідин-1-іл)-4,7,10,13,16-пентаоксанадекан-1,19-діоат (І1) (100 мг, 0,19 ммоль, 1 екв.) у безводному етилацетаті (15 мл) гідрували при 30 psi у присутності 10 % паладію на вугіллі (10 мг, 10 мас. %) протягом 45 хвилин. Реакційну суміш фільтрували через целіт, промиваючи безводним етилацетатом. Після упарювання при зниженому тиску отримували продукт І2 у вигляді безбарвної олії (74 мг, 89 %). Результати випробувань: R_T (не виявляється за допомогою РХ) МС (ES+) m/z (відносна інтенсивність) 458 ($[M+Na]^+$; 55), 436 ($[M+H]^+$; 12).

Сполука І3

До розчину амінодипептиду (12с) (50 мг, $5,42 \times 10^{-5}$ моль, 1,0 екв.) та складного ефіру NHS та кислоти-dPeg®5 (І2) (28 мг, $6,5 \times 10^{-5}$ моль, 1,2 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) додавали N, N-диізопропілдіетиламін (8,4 мкл, 6 мг, $5,97 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Реакційну суміш упарювали при зниженому тиску з одержанням блідо-жовтої олії. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 96 % хлороформ/4 % метанол – 92 % хлороформ/8 % метанол з кроком підвищення концентрації 0,5 %] отримували продукт І3 у вигляді жовтого склоподібного продукту (42 мг, 64 %). Результати випробувань: R_T 2,78 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1242 ($[M+H]^+$; 40).

Сполука 49

До розчину N-гідроксисукциніміду (5,8 мг, $5,06 \times 10^{-5}$ моль, 1,7 екв.) та кислоти (І3) у безводному ДХМ (6 мл) додавали 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід (9,1 мг, $4,76 \times 10^{-5}$ моль, 1,6 екв.) у атмосфері азоту. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 48 годин. Розчин фільтрували, промиваючи ДХМ (10 мл). ДХМ розчин промивали водою (20 мл), сольовим розчином (20 мл), сушили ($MgSO_4$) й упарювали при зниженому тиску. Продукт 49 (32 мг, 80 %) використовували без додаткового очищення. Результати випробувань: R_T 2,88 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1339 ($[M+H]^+$; 100).

Сполука 50

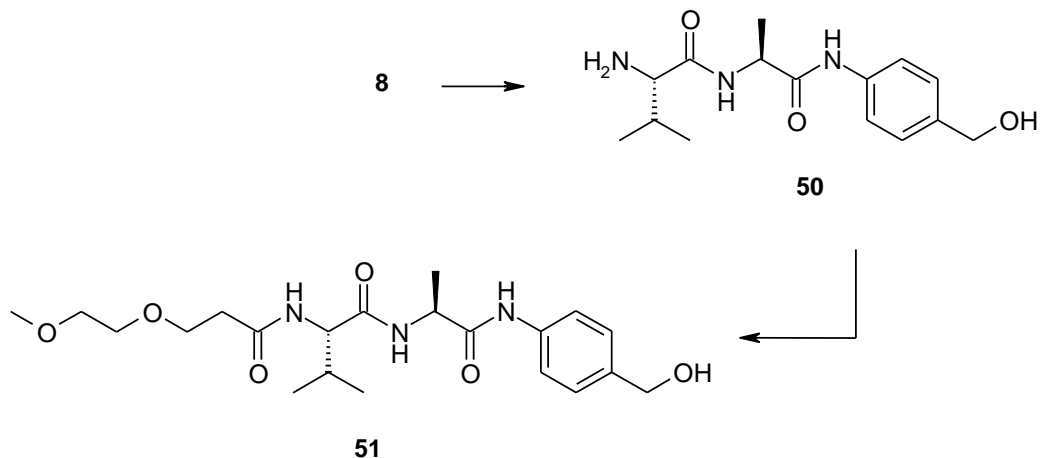
До розчину аллос-сполуки (8) (2,0 г, 5,3 ммоль, 1,0 екв.) та піролідину (0,47 г, 0,55 мл, 6,63 ммоль, 1,25 екв.) у безводному ДХМ в атмосфері азоту додавали $Pd(PPh_3)_4$ (61 мг, 0,053 ммоль, 0,01 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин. За допомогою РХ/МС виявляли присутність Аллос-сполуки, яка не прореагувала. Додавали додаткові порції піролідину (0,38 г, 0,44 мл, 5,3 ммоль, 1,0 екв.) та $Pd(PPh_3)_4$ (61 мг, 0,053 ммоль, 0,01 екв.) й реакцію продовжували протягом ще 30 хвилин. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ, потім 98 % хлороформ/2 % метанол – 90 % хлороформ/10 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт 50 у вигляді білого порошку (1,37 г, 88 %). Результати випробувань: R_T 0,33 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 294 ($[M+H]^+$; 60), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 292 ($[M-H]^-$; 100).

Сполука 51

До розчину амінодипептиду (50) (1,37 г, 4,69 ммоль, 1 екв.) та кислоти m-dPeg®2 (0,73 г, 4,93 ммоль, 1,05 екв.) у безводному ТГФ (60 мл) додавали EEDQ (1,22 г, 4,93 ммоль, 1,05 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 5 днів. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії [100 % хлороформ – 95 % хлороформ/5 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] з отриманням продукту 51 у вигляді твердої речовини білого кольору (1,46 г, 74 %). Результати випробувань: R_T 2,22 хв; МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 446 ($[M+Na]^+$; 80), 424 ($[M+H]^+$; 70), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 422 ($[M-H]^-$; 100).

Синтез сполуки 51 показаний нижче на Схемі 14.

Схема 14



Сполука 52

До розчину, який містить одну захисну групу Аллос біс-аніліну (6) (1,68 г, 2,12 ммоль, 1 екв.) та трифосгену (0,226 г, 0,76 ммоль, 0,36 екв.) у безводному ТГФ (40 мл) при перемішуванні в атмосфері азоту при кімнатній температурі додавали триетиламін (0,47 г, 0,65 мл, 4,66 ммоль,

2,2 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 40 °С, зразок обробляли метанолом та виявляли за допомогою РХ/МС як метилкарбамат.

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин dPeg®2-бензилового спирту (51) (1,35 г, 3,18 ммоль, 1,5 екв.) та триетиламіну (0,32 г, 0,44 мл, 3,18 ммоль, 1,5 екв.) у безводному ТГФ (60 мл). За ходом реакції стежили за допомогою РХ/МС з інтервалами 30 хвилин. Через 3 години за допомогою РХ/МС спостерігали утворення продукту, присутність метилкарбамату та моно-аллос-захищеного біс-аніліну (9). Додавали додаткову порцію трифосгену (0,056 г, 0,19 ммоль, 0,09 екв.) і реакцію продовжували при 40 °С протягом ще 3 годин. Реакційну суміш упарювали насухо з отриманням технічного продукту у вигляді жовтої олії, яку очищали за допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 95 % хлороформ/5 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] з отриманням бажаного продукту 52 у вигляді жовтої піни (1,91 г, 73 %). Результати випробувань: R_T 3,42 хв МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1243 ($[M+H]^+$; 50), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1241 ($[M-H]^-$; 100).

Сполука 53

До розчину Аллос-сполуки (52) (1,87 г, 1,5 ммоль, 1,0 екв.) та піролідину (0,27 мг, 310 мкл, 3,8 ммоль, 2,5 екв.) у безводному ДХМ (30 мл) в атмосфері азоту додавали $Pd(PPh_3)_4$ (35 мг, $3,0 \times 10^{-5}$ моль, 0,02 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску й продукт очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 95 % хлороформ/5 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] з отриманням продукту 53 у вигляді жовтої піни (1,57 г, 90 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 3,17 хв, МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1159 ($[M+H]^+$; 65).

Сполука 54

До розчину моно-захищеного біс-аніліну (53) (1,37 г, 1,18 ммоль, 1 екв.) та трифосгену (0,126 г, 0,43 ммоль, 0,36 екв.) у безводному ТГФ (40 мл) при перемішуванні в атмосфері азоту при кімнатній температурі додавали триетиламін (0,26 г, 0,36 мл, 2,6 ммоль, 2,2 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 40 °С, зразок обробляли метанолом й виявляли за допомогою РХ/МС як метилкарбамат, що вказує на повне утворення ізоціанату.

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин бензилового спирту (8) (0,67 г, 1,8 ммоль, 1,5 екв.) та триетиламіну (0,18 г, 0,25 мл, 1,8 ммоль, 1,5 екв.) у безводному ТГФ (50 мл). За реакцією стежили за допомогою РХ/МС, реакція завершувалася через 18 годин при 40 °С. Реакційну суміш випарювали насухо з отриманням жовтої олії, яку очищали за допомогою флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 95 % етилацетат/5 % метанол – 93 % етилацетат/7 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] з отриманням цільового продукту 54 у вигляді білої піни (1,21 г, 66 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 3,42 хв, МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1562 ($[M+H]^+$; 15).

Сполука 55

До розчину ацетату (54) (1,18 г, 0,756 ммоль, 1 екв.) у метанолі (29 мл) додавали розчин K_2CO_3 (0,522 г, 3,78 ммоль, 5 екв.) у H_2O (5,0 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Метанол випарювали при зниженому тиску, осад розбавляли H_2O (50 мл) та екстрагували етилацетатом (3 × 100 мл). Об'єднані етилацетатні екстракти промивали H_2O (200 мл), сольовим розчином (200 мл), сушили ($MgSO_4$) й упарювали при зниженому тиску з отриманням продукту 55 у вигляді білої піни (1,052 г, 94 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 3,15 хв, МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1478 ($[M+H]^+$; 5), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1477 ($[M-H]^-$; 100).

Сполука 56

До розчину біс-деацетильованого продукту (55) (0,252 г, 0,17 ммоль 1 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) в атмосфері азоту додавали однією порцією періодат Деса-Мартіна (0,152 г, 0,36 ммоль, 2,1 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин, після чого за допомогою РХ/МС відмічали завершення реакції. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (50 мл) та промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію (3 × 100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл) і сушили ($MgSO_4$). Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 92 % хлороформ/8 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт 56 у вигляді білої піни (0,17 г, 68 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 6,17 хв, МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1474 ($[M+H]^+$; 5), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1472 ($[M-H]^-$; 100).

Сполука 57

До розчину аллос-сполуки (56) (160 мг, 0,108 ммоль, 1,0 екв.) та 0,5 М розчину піролідину в

ДХМ (0,27 мл, 0,135 ммоль, 1,25 екв.) додавали $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (8 мг, 6,9 мкмоль, 6,0 екв.) у безводному ДХМ (18 мл) у атмосфері азоту. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 100 % хлороформ – 91 % хлороформ/9 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт 57 у вигляді білого порошку (0,114 г, 74 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 2,60 хв, МС (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1390 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 5).

Поєднання малеїмід-PEG-сукцинімідного реагента зі сполукою 57 призводить до отримання сполуки РВД лікарський засіб-лінкер 58. На Фігурі 1b показані структури сполуки РВД лікарський засіб-лінкер MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 58, де MP являє собою малеїмідопропанамід, PEG являє собою етиленокси і PAB являє собою пара-амінобензилоксикарбоніл, та імр являє собою захисну групу N-10 імінної групи: 3-(2-метоксиетокси)пропаноат-Val-Ala-PAB.

Сполука 58 (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-5-ізопропіл-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамідо)бензил 11-гідрокси-8-(5-((11S, 11aS)-11-гідрокси-10-((4-((10S, 13S)-10-ізопропіл-13-метил-8,11-диоксо-2,5-диокса-9,12-дiazатетрадеканамідо)бензилокси)карбоніл)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагідро-піролбензо[2,1-c][1,4]діазепін-8-ілокси)пентилокси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагідропіролбензо[2,1-c][1,4]діазепін-10(5H)-карбоксилат)

До розчину амінодипептиду (57) (55 мг, $3,96 \times 10^{-5}$ моль, 1,0 екв.) та складного ефіру малеїмід-dPeg®8-NHS (33 мг, $4,75 \times 10^{-5}$ моль, 1,2 екв.) у безводному ДХМ (6 мл) додавали 0,5 М розчин N, N-диізопропілдиетиламіну у безводному ДХМ (176 мкл, $8,8 \times 10^{-5}$ моль, 2,2 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Реакційну суміш упарювали при зниженому тиску й залишок перерозчиняли у ДХМ (50 мл). ДХМ розчин екстрагували насиченим розчином бікарбонату натрію (2 × 100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO_4) й упарювали при зниженому тиску з одержанням жовтого в'язкого продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: хлороформ – 91 % хлороформ/9 % метанол, з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт 58 у вигляді білої піни (41 мг, 52 %). Результати випробувань: R_T , хв.: 5,8 хв, МС (MaldiTOF) m/z (відносна інтенсивність) 1987,9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; 100).

Кон'югат 60

Пептид біотин-A20FMDV-Cys (59), який є високо селективним відносно інтегрину $\alpha_v\beta_6$, продукція якого значно підвищена в багатьох ракових пухлинах, був обраний для кон'югування РВД-лінкерних похідних. До розчину сполуки (58) (5,05 мг, 2,57 мкмоль, 1,0 екв.) у суміші ацетонітрил/вода 1/1 (2 мл) додавали розчин пептиду (59) (7,7 мг, 3,08 мкмоль, 1,2 екв.) у суміші 1/1 ацетонітрил/вода (1 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Ацетонітрил випарювали при зниженому тиску й воду видаляли ліофілізацією з отриманням продукту 60 у вигляді білої піни. У результаті очищення за допомогою напівпрепаративної ВЕРХ з подальшою ліофілізацією отримували продукт у вигляді білої піни (3,4 мг, 29 %). Результати випробувань: МС (MaldiTOF) m/z (відносна інтенсивність) 4458,3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

Сполука 61 (MP-PEG24-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-16-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-5-ізопропіл-2-метил-4,7,14-триоксо-10-окса-3,6,13-триазагексадеканамідо)бензил 11-гідрокси-8-((5-((11S, 11aS)-11-гідрокси-10-((4-((10S, 13S)-10-ізопропіл-13-метил-8,11-диоксо-2,5-диокса-9,12-дiazатетрадеканамідо)бензилокси)карбоніл)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пентил)окси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат)

До розчину амінодипептиду (57) (27 мг, $1,94 \times 10^{-5}$ моль, 1 екв.) та складного ефіру малеїмід-dPeg®24-NHS (30 мг, $2,13 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.) у безводному ДХМ (5 мл) додавали N, N-диізопропілдиетиламін (6 мкл, $4,3 \times 10^{-5}$ моль, 2,2 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Реакційну суміш упарювали при зниженому тиску й залишок перерозчиняли в ДХМ (25 мл). Розчин ДХМ екстрагували насиченим розчином бікарбонату натрію (2 × 50 мл), водою (50 мл), сольовим розчином (50 мл), сушили (MgSO_4) й упарювали при зниженому тиску з одержанням жовтого в'язкого продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: хлороформ – 91 % хлороформ/9 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді безбарвного в'язкого продукту (22 мг, 42 %). Результати випробувань: МС (MaldiTOF) m/z (відносна інтенсивність) 2691,8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 100).

(2S, 2'S, E)-диметил 1,1'-(4,4'-(пропан-1,3-диілбіс(окси))біс(5-метокси-2-нітробензоїл))біс(4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-2-карбоксилат) (71)

До суміші трифлату 40 (230 мг), транс-пропенілборної кислоти (52,3 мг) та карбонату натрію (129 мг) у суміші толуолу (5 мл), етанолу (2,5 мл) та води (2,5 мл) додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладій(0) (21,6 мг). Реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом 3 годин в атмосфері аргону при 32 °С. Реакційну суміш розбавляли етилацетатом та промивали водою, сольовим розчином і сушили над сульфатом магнію. Після фільтрування надлишок етилацетату видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску. Технічний продукт реакції сполучення очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії (силікагель; градієнт 50 %/50 % етилацетат/гексан – 80 %/20 % етилацетат/гексан). Чисті фракції об'єднували й після видалення надлишку елюенту отримували чистий продукт 71 у вигляді твердої речовини помаранчевого кольору (110 мг, вихід 61,4 %, РХ/МС, 3,52 хв, m/z ES⁺764,92). Реакцію масштабували з отриманням 7,21 г продукту реакції поєднання Сузукі. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,92 (s, 2H), 5,98 (d, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,46-5,55 (m, 2H), 5,10 (dd, 2H), 4,37 (t, 4H), 3,93-4,00 (m, 6H), 3,86 (s, 6H), 3,19-3,26 (m, 2H), 2,80 (dd, 2H), 2,45-2,51 (m, 2H), 1,77 (d, 6H OCH₃).

(S, E)-((пропан-1,3-диілбіс(окси))біс(5-метокси-2-нітро-4,1-фенілен))біс(((S)-2-(гідроксиметил)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-1-іл)метанон) (72)

До розчину боргідриду літію (622 мг) у безводному тетрагідрофурані (300 мл) при 0 °С (на льодяній бані) додавали однією порцією твердий складний біс-ефір 71 (7,21 г). Льодяну баню прибирали й реакційну суміш залишали до досягнення кімнатної температури. Через 1 годину за допомогою ТШХ (після виділення невеликої кількості продукту за допомогою водного етилацетату) спостерігали, що реакція не завершувалася, і тому додавали додаткову порцію боргідриду літію (0,75 екв.). Реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом ще 2,5 годин, після чого за допомогою ТШХ (після виділення невеликої кількості продукту реакції) спостерігали завершення реакції. Залишковий боргідрид літію гасили великим надлишком етилацетату (на льодяній бані) й реакційну суміш залишали при перемішуванні протягом 50 хвилин. Органічну фазу промивали водою, сольовим розчином та сушили над сульфатом магнію. Сульфат магнію видаляли вакуумним фільтруванням і етилацетат видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням діолу 72 (5,46 г, вихід 82 %), який використовували в наступній реакції без додаткового очищення (РХ/МС 3,17 хв, m/z ES⁺708,84). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,85 (s, 2H), 5,97 (d, 2H), 5,77 (s, 2H), 5,61-5,53 (m, 2H), 4,75-4,82 (m, 2H), 4,38 (t, 4H), 3,89-4,00 (m, 12H), 3,01-3,08 (m, 2H) 2,46-2,51 (m, 4H), 1,77 (d, 6H OCH₃).

((2S, 2'S, E)-1,1'-(4,4'-(пропан-1,3-диілбіс(окси))біс(5-метокси-2-нітробензоїл))біс(4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-2,1-диіл))біс(метилен)диацетат (73)

До розчину біс-спирту 72 (6,2 г) у дихлорметані (200 мл) у присутності триетиламіну (3,68 мл) при 0 °С додавали по краплях розчин ацетилхлориду (1,64 мл) у безводному дихлорметані (40 мл). Реакційну суміш залишали до досягнення кімнатної температури й спостерігали за реакцією за допомогою ТШХ та РХ/МС. Після завершення реакції органічну фазу промивали послідовно водою, лимонною кислотою (0,5N), насиченим розчином бікарбонату натрію та сольовим розчином. Органічний шар сушили над сульфатом магнію, фільтрували й надлишок дихлорметану видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою хроматографією (силікагель; градієнт 60 % етилацетат/40 % гексан – 70 % етилацетат/30 % гексан). Чисті фракції об'єднували та після видалення надлишку елюенту отримували біс-ацетат 73 (2,50 г, вихід 36 %, РХ/МС 3,60 хв, m/z ES⁺792,63). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,77 (d, J=3,4 Гц, 2H), 6,89 (s, 2H), 5,99 (d, J=15,2 Гц, 2H), 5,78 (s, 2H), 5,65 – 5,45 (m, J=15,4, 6,8 Гц, 2H), 5,02 – 4,86 (m, J=9,7, 5,5 Гц, 2H), 4,57 (s, 2H), 4,37 (t, J=5,9 Гц, 4H), 4,00 (s, 6H), 3,10 – 2,92 (m, J=10,7 Гц, 2H), 2,60 (dd, J=16,3, 3,1 Гц, 2H), 2,52 – 2,43 (m, 2H), 2,10 (s, 6H), 1,78 (d, J=6,7 Гц, 4H).

((2S, 2'S, E)-1,1'-(4,4'-(пропан-1,3-диілбіс(окси))біс(2-аміно-5-метоксибензоїл))біс(4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-2,1-диіл))біс(метилен)диацетат (74)

До розчину біс-нітросполуки 73 (2,5 г) у етанолі (20 мл) та етилацетату (20 мл) додавали цинковий порошок (10 г) з наступним додаванням розчину мурашиної кислоти в етанолі (5 % об./об.; 100 мл). Реакція була екзотермічною, при цьому температура підвищувалася до 33 °С, дану температуру знижували до 15 °С за допомогою льодяної бані й реакційну суміш залишали при перемішуванні при ретельному моніторингу за допомогою ТШХ та РХ/МС. Через 30 хв реакцію вважали завершеною, оскільки не виявляли слідів початкових реагентів або проміжних сполук. Суміш декантували й фільтрували через бавовняну вату. Фільтрат обробляли етилацетатом (300 мл) та насиченим водним розчином NaHCO₃ (300 мл). Органічний шар додатково промивали сольовим розчином (200 мл) і сушили над сульфатом магнію. Надлишок розчинників видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням

продукту 74 (2,09 г; вихід 90 %, PX/MC 3,35 хв, m/z ES⁺732,06). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,76 (s, 2H), 6,45 (s, 2H), 6,33 (s, 2H), 6,12 (d, J=15,3 Гц, 2H), 5,54 (dq, J=13,2, 6,6 Гц, 2H), 4,90 (td, J=9,6, 4,5 Гц, 2H), 4,48 (s, 4H), 4,42 – 4,33 (m, 4H), 4,23 (t, J=6,1 Гц, 4H), 3,79 (s, 6H), 2,95 (dd, J=16,0, 10,4 Гц, 2H), 2,55 (dd, J=16,2, 3,5 Гц, 2H), 2,42 – 2,32 (m, 2H), 2,07 (s, 6H), 1,81 (d, J=6,6 Гц, 6H).

((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(ацетоксиметил)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-1-карбоніл)-5-(((алілокси)карбоніл)аміно)-2-метоксифеноксипропокси)-2-аміно-5-метоксибензоіл)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-2-іл)метил (75)

До розчину біс-аніліну 74 і піридину у безводному дихлорметані при -78 °C додавали по краплях розчин алілхлороформіату в безводному дихлорметані. Реакційну суміш залишали при перемішуванні при -78 °C протягом 2 годин і потім залишали до досягнення кімнатної температури. Реакційну суміш промивали послідовно водним розчином сульфату міді (II), водою, насиченим розчином бікарбонату натрію та сольовим розчином. Органічний шар сушили над сульфатом магнію, фільтрували у вакуумі й надлишок дихлорметану видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску. За допомогою ТШХ та PX/MC виявляли присутність як цільового моно-allos-продукту 75, так і біс-allos-продукту. Суміш продуктів очищали колонковою хроматографією (силікагель; градієнт 40 % етилацетат/60 % гексан – 70 % етилацетат/40 % гексан). Чисті фракції, які містять цільовий моно-allos-продукт 75, збирали та об'єднували, надлишок елюенту видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням продукту (580 мл, вихід 25 %). PX/MC 3,58 хв., ES⁺817,02 ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,60 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,42 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,33 (s, 1H), 6,08 (dd, J=15,4, 6,1 Гц, 2H), 6,00 – 5,87 (m, 1H), 5,62 – 5,44 (m, 2H), 5,34 (dd, J=17,2, 1,4 Гц, 1H), 5,23 (dd, J=10,4, 1,2 Гц, 1H), 4,88 (qd, J=9,5, 4,5 Гц, 2H), 4,67 – 4,57 (m, 2H), 4,50 – 4,25 (m, 8H), 4,22 (t, J=6,3 Гц, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,00 – 2,85 (m, 2H), 2,58 – 2,47 (m, 2H), 2,37 (p, J=6,1 Гц, 2H), 2,06 (s, 6H), 1,81 – 1,73 (m, 6H).

((2S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(ацетоксиметил)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-1-карбоніл)-5-(((4-(2-(2-(((алілокси)карбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-пропанамідо)бензил)окси)карбоніл)аміно)-2-метоксифеноксипропокси)-2-(((алілокси)карбоніл)аміно)-5-метоксибензоіл)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-2-іл)метил ацетат (76)

До розчину біс-аніліну 75 (560 мг), який містить одну захисну групу allos, і трифосгену (72 мг) у безводному тетрагідрофурані (20 мл) при перемішуванні в інертній атмосфері додавали безводний триетиламін (0,206 мл). Реакційну суміш гріли при 40 °C, відбирали пробу та обробляли її метанолом. За допомогою PX/MC спостерігали повне перетворення в метилкарбамат, що вказує на те, що вільна аміногрупа була успішно перетворена в реакційноздатну ізоціанатну проміжну сполуку. Розчин allos-val-ala-PAВОН (381 мг) та триетиламіну (0,14 мл) у безводному тетрагідрофурані (20 мл) швидко вводили до реакційної посудини при 40 °C. Реакційну суміш залишали при перемішуванні при кімнатній температурі протягом ночі, після чого відбирали пробу й обробляли її метанолом. За допомогою PX/MC підтверджували відсутність слідів метилкарбамату, що вказує на повне витрачання ізоціанату. Реакційну суміш випарювали насуху з отриманням технічного продукту, який очищали за допомогою колонкової хроматографії (силікагель; градієнт: хлороформ – 2 % метанол/98 % хлороформ). Чисті фракції збирали та об'єднували й після видалення надлишку елюенту за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували чистий продукт 76 (691 мг, вихід 84 %). PX/MC, 3,73 хв, ES⁺1220,21.

Аліл-4-(2-(2-(((алілокси)карбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)пропанамідо)бензил ((S, E)-(пропан-1,3-діілбіс(окси))біс(2-((S)-2-(гідроксиметил)-4-((E)-проп-1-ен-1-іл)-2,3-дигідро-1H-пірол-1-карбоніл)-4-метокси-5,1-фенілен))дикарбамат (77)

До розчину біс-ацетату 76 (680 мг) у метанолі (29 мл) при кімнатній температурі додавали водний розчин карбонату калію (770 мг у 4,8 мл води). За результатами PX/MC деацетилювання завершувалося через 30 хвилин. Реакційну суміш розбавляли дихлорметаном (200 мл) і органічну фазу промивали послідовно лимонною кислотою (0,5N, 100 мл), водою (200 мл) та сольовим розчином (100 мл). Органічну фазу сушили над сульфатом магнію, суспензію фільтрували (вакуумне фільтрування) та надлишок розчинника видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою хроматографією (силікагель; градієнт 1,5 % метанол/98,5 % хлороформ – 3,5 % метанол/96,5 % хлороформ). Чисті фракції об'єднували й після видалення надлишку елюенту за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували діол 77 (530 мг, вихід 84 %). PX/MC, 3,40 хв, ES⁺1136,49.

(11S, 11aS)-аліл 8-(3-(((11S, 11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((алілокси)карбоніл)аміно)-3-

метилбутанамідо)пропанамідо)бензил)окси)карбоніл)-11-гідрокси-7-метокси-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-5,10,11,11а-тетрагідро-пірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пропокси)-11-гідрокси-7-метокси-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-11,11а-дигідропірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-10(5Н)-карбоксилат (78)

5 До розчину сполуки 77 (250 мг) та піридину (0,36 мл, 20 екв.) у безводному дихлорметані (10 мл) при кімнатній температурі додавали однією порцією періодат Деса-Мартіна (373 мг, 4 екв.). У результаті ретельного моніторингу за допомогою ТШХ (5 % метанол/хлороформ) показували зникнення початкових реагентів через 30 хвилин. Реакцію зупиняли за допомогою розчину метабісульфіту натрію та гідрокарбонату натрію з наступним додаванням сольового розчину.

10 Шар дихлорметану сушили над сульфатом магнію та фільтрували у вакуумі. Розчин дихлорметану потім обробляли каталітичною кількістю DMAP (с. 10 мг), що призводило до злиття плям основного продукту, які спостерігали за допомогою ТШХ/РХ/МС. Розчин фільтрували й дихлорметан видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску. Отриманий залишок очищали колонковою хроматографією (силікагель; градієнт 1,5 %

15 метанол/98,5 % хлороформ – 3 % метанол/97 % хлороформ). Чисті фракції збирали та після видалення елюенту за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску отримували цільовий циклічний продукт 78 (62 мг, вихід 25 %). РХ/МС, 3,35 хв, $ES^+1132,19$, $ES^-1130,25$.

(11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)пропанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-5,11а-дигідропірол[2,1-с][1,4]d-бензодіазепін-8-іл)окси)пропокси)-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-11,11а-дигідропірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-10(5Н)-карбоксилат (79)

20

До розчину allos-сполуки (78) (62 мг) та піролідину (22,6 мкл) у безводному ДХМ (3 мл) додавали $Pd(PPh_3)_4$ (1,9 мг) у атмосфері аргону. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 1,5 години. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Після очищення

25 за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: сумішшю 3 % метанол/97 % хлороформ – 90 % хлороформ/10 % метанол] отримували продукт у вигляді білого порошку (26 мг, 50 %). РХ/МС: R_T 2,70 хвилин, МС (ES^+) 946,17.

(11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-25-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)-5-ізопропіл-2-метил-4,7,23-триоксо-10,13,16,19-тетраокса-3,6,22-триазапентакозанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-5,11а-дигідропірол[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пропокси)-5-оксо-2-((Е)-проп-1-ен-1-іл)-11,11а-дигідропіролбензо[2,1-с][1,4]діазепін-10(5Н)-карбоксилат (80)

30

До розчину амінодипептиду 79 (13 мг) та складного ефіру малеїмід-dPeg@4-NHS (8,5 мг) у безводному ДХМ (4 мл) додавали розчин N, N-диізопропілдетиламіну (2,6 мкл). Отриманий розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Реакційну суміш випарювали при зниженому тиску й залишок піддавали очищенню напівпрепаративною ТШХ (10 % метанол/90 % хлороформ) з отриманням чистого зразка цільового малеїмиду 14. РХ/МС, час утримування 2,87 хвилин, $ES^+1344,29$.

35

Вос-Val-Cit-PAВОН (82)

40 До розчину H-Cit-OH (5,85 г, 33,4 ммоль, 1,05 екв.) та $NaHCO_3$ (2,94 г, 34,9 ммоль, 1,1 екв.) у ТГФ (50 мл) і H_2O (100 мл) додавали розчин Вос-Val-OSu (10,0 г, 31,8 ммоль, 1 екв.) у ТГФ (50 мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин і ТГФ випарювали при зниженому тиску. Доводили рН до 3 за допомогою лимонної кислоти з випаданням в осад білого в'язкого продукту. Отриману суміш екстрагували сумішшю 10 % ізопропанол/етилацетат (8 × 150 мл), об'єднані екстракти промивали сольовим розчином (300 мл) і сушили ($MgSO_4$). У результаті випаровування при зниженому тиску отримували білу піну, яку сушили при

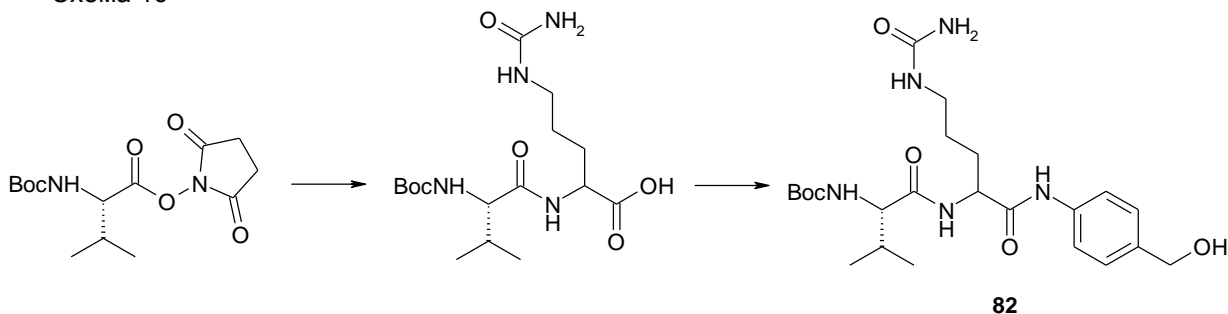
45 зниженому тиску протягом 18 годин. Піну суспендували в ефірі при обробці ультразвуком з наступним фільтруванням і отриманням продукту у вигляді дрібнодисперсного білого порошку (10,6 г, 89 %). Порцію даної речовини (7,2 г, 19,2 ммоль, 1 екв.), п-амінобензилового спирту (2,6 г, 21,15 ммоль, 1,1 екв.) та EEDQ (9,5 г, 38, 5 ммоль, 2,0 екв.) у ДХМ/MeOH (100 мл/50 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Розчинник випарювали при

50 зниженому тиску і в'язкий залишок розтирали в ефірі при обробці ультразвуком, отриманий продукт відфільтровували та сушили при зниженому тиску з отриманням продукту 82 у вигляді твердої речовини білого кольору (6,6 г, 71 %). Результати випробувань: R_T 2,42 хв; (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 479,8 ($[M+1]^+$; 60), МС (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 477, 6 ($[M-H]^-$; 90).

55

Синтез сполуки 82 показаний нижче на схемі 16.

Схема 16



((S)-1-(4-((5-(4-((S)-2-(ацетоксиметил)-4-метилєпіролідин-1-карбоніл)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-
 5 ((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-
 уреїдопєнтанамідо)бензил)окси)карбоніл)аміно)-2-метоксиєнокси)пєнтил)окси)-2-
 (((алілокси)карбоніл)аміно)-5-метоксибензоїл)-4-метилєпіролідин-2-іл)метилацетат (83)

До розчину біс-аніліну (6) (0,505 г, 0,64 ммоль, 1 екв.), який містить одну захисну групу allos, та трифосгену (0,068 г, 0,23 ммоль, 0,36 екв.) у безводному ТГФ (10 мл) при перемішуванні в атмосфері аргону при кімнатній температурі додавали триєтиламін (0,14 г, 0,19 мл 1,4 ммоль, 2,2 екв.). Реакційну суміш нагрівали до 40 °С, зразок обробляли метанолом і виявляли за допомогою РХ/МС як метилкарбамат.

До свіжоприготованого ізоціанату додавали по краплях розчин бензильового спирту (82) (0,46 г, 0,96 ммоль, 1,5 екв.) та триєтиламін (0,096 г, 0,13 мл, 0,96 ммоль, 1,5 екв.) у безводному ТГФ/ДМФА (20 мл/1 мл). За реакцією спостерігали за допомогою РХ/МС, і зазначена реакція завершувалася через 2 години при 40 °С. Реакційну суміш випарювали насуху й залишок обробляли сумішшю 10 % ізопропанол/ДХМ та водою. Органічний шар відокремлювали й промивали водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO₄) та випарювали при зниженому тиску з отриманням коричневої піни. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елювання: хлороформ – 93 % хлороформ/7 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт у вигляді твердої речовини білого кольору (0,5 г, 60 %). Результати випробувань: R_T 3,42 хв; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 1298 ([M+H]⁺; 100).

Аліл-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-
 25 уреїдопєнтанамідо)бензил ((S)-(пєнтан-1,5-диїлбіс(окси))біс(2-((S)-2-(гідрокси-метил)-4-метилєпіролідин-1-карбоніл)-4-метокси-5,1-єнілен))дикарбамат (84)

До розчину ацетату (83) (0,49 г, 0,4 ммоль, 1 екв.) у метанолі (10 мл) додавали розчин K₂CO₃ (0,28 г, 2,0 ммоль, 5,4 екв.) у H₂O (2 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Метанол випарювали при зниженому тиску, осад розбавляли H₂O (10 мл) й підкислювали до рН 3 за допомогою 1М розчину лимонної кислоти. Суміш екстрагували ДХМ (4 × 50 мл) і об'єднані екстракти промивали сольовим розчином (100 мл), сушили (MgSO₄) й упарювали при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді білої піни (0,43 г, 94 %). Результати випробувань: R_T 3,12 хв; МС (ES⁺) m/z (відносна інтенсивність) 1214 ([M+H]⁺; 100), МС (ES⁻) m/z (відносна інтенсивність) 1212 ([M-H]⁻; 100).

(11S, 11aS)-аліл-8-((5-(((11S, 11aS)-10-(3-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопєнтанамідо)єніл)пропанол)-11-гідрокси-7-метокси-2-метилєн-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гєксагідро-1H-пірол[2,1-с][1,4]єнзодіазепін-8-іл)окси)пєнтил)окси)-11-гідрокси-7-метокси-2-метилєн-5-оксо-2,3,11,11a-тєтрагідро-1H-пірол[2,1-с][1,4]єнзодіазепін-10(5H)-карбоксилат (85)

До розчину біс-деацетильованого продукту (55) (0,147 г, 0,12 ммоль, 1 екв.) у безводному ДМСО (4 мл) в атмосфері азоту додавали однією порцією стабілізовану 45 мас. % 2-йодоксиєнзойну кислоту (IBX) (0,18 г, 0,29 ммоль, 2,4 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 26 годин. Додавали додаткову порцію IBX (15 мг, 2,4 × 10⁻⁵ ммоль, 0,2 екв.) і реакцію продовжували протягом ще 18 годин. Реакційну суміш розбавляли H₂O (10 мл), екстрагували 10 % MeOH/ДХМ (4 × 25 мл) і об'єднані екстракти промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію (2 × 100 мл), водою (100 мл), сольовим розчином (100 мл) та сушили (MgSO₄). Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску з отриманням технічного продукту. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елювання: від 100 % дихлорметан до 94 % дихлорметан/6 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] отримували продукт 85 у вигляді твердої речовини білого кольору (77 мг, 53 %). Результати випробувань: R_T 2,98 хв; МС (ES⁺) m/z

(відносна інтенсивність) 1210 ($[M+H]^+$; 100), MC (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1208 ($[M-H]^-$; 100).

(11S, 11aS)-аліл-8-((5-(((11S, 11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)-11-гідрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11а-гексагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пентил)-окси)-11-гідрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат (86)

До сполуки (85), яка містить захисну групу Boc (72 мг, $6,0 \times 10^{-5}$ моль), при 0 °C додавали холодну трифтороцтову кислоту (3 мл). Розчин перемішували при зазначеній температурі протягом 15 хвилин. Реакційну суміш виливали на лід та доводили pH до pH 8 за допомогою насиченого розчину $NaHCO_3$. Розчин екстрагували ДХМ (4 × 25 мл), об'єднані екстракти промивали насиченим сольовим розчином (100 мл), сушили ($MgSO_4$) й упарювали при зниженому тиску з одержанням продукту у вигляді твердої речовини білого кольору (55 мг, 83 %). Результати випробувань: R_T 2,53 хв; MC (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1110 ($[M+H]^+$; 100), MC (ES^-) m/z (відносна інтенсивність) 1108 ($[M-H]^-$; 100).

(11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,11а-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пентил)окси)-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат (86)

До розчину алос-сполуки (85) (80 мг, 72 мкмоль, 1,0 екв.) та піролідину (30 мкл, 26 мг, 0,36 ммоль, 5 екв.) у безводному ДХМ (3 мл) у атмосфері азоту додавали $Pd(PPh_3)_4$ (2,7 мг, 2,3 мкмоль, 0,03 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску. Після очищення за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: 90 % хлороформ/10 % метанол – 76 % хлороформ/24 % метанол] отримували продукт у вигляді білого порошку (62,5 г, 86 %). Результати випробувань: R_T 2,45 хв; MC (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1008 ($[M+H]^+$; 80).

(11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 11-гідрокси-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,11а-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-8-іл)окси)пентил)окси)-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагідро-1H-пірол[2,1-c][1,4]бензодіазепін-10(5H)-карбоксилат (87)

До розчину амінодипептиду (86) (14,2 мг, $1,4 \times 10^{-5}$ моль, 1 екв.) і складного ефіру NHS- і 6-малеїмідгексанової кислоти (4,8 мг, $1,55 \times 10^{-5}$ моль, 1,1 екв.) у безводному ДХМ/DMA (2 мл/0,2 мл) у атмосфері аргону додавали N, N-диізопропілдіетиламін (12 мкл, $7,1 \times 10^{-5}$ моль, 5,0 екв.). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин. Реакційну суміш випарювали при зниженому тиску й осад очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії [градієнтне елюювання: хлороформ – 93 % хлороформ/7 % метанол з кроком підвищення концентрації 1 %] з отриманням продукту у вигляді білуватої піни (5 мг, 29 %). Результати випробувань: R_T 2,83 хв, MC (ES^+) m/z (відносна інтенсивність) 1201 ($[M+H]^+$; 100).

Відновлення/Окислення ThioMab для кон'югації

Повнорозмірні, створені на основі цистеїну моноклональні антитіла (ThioMab), які експресуються в клітинах CHO, відновлювали приблизно 20-40-кратним надлишком TCEP (гідрохлориду трис(2-карбоксиетил)фосфіну) або ДТТ (дитіотреїтолу) в 50 мМ Трис pH 7,5 із 2 мМ EDTA протягом 3 годин при 37 °C або протягом ночі при кімнатній температурі (Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Беверлі, Массачусетс). Відновлені ThioMab розбавляли та наносили на колонку HiTrap S у 10 мМ ацетату натрію, pH 5, та елюювали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), який містить 0,3 М хлорид натрію. Альтернативно, антитіло підкислювали шляхом додавання 1/20 об'єму 10 % оцтової кислоти, розбавляли 10 мМ сукцинатом, pH 5, наносили на колонку й потім промивали сукцинатним буфером 10 об'ємами колонки. Колонку елюювали розчином, що містить 50 мМ Трис pH 7,5, 2 мМ EDTA.

Елюювані відновлені ThioMab обробляли 200 нМ водним розчином сульфату міді ($CuSO_4$) або 15-кратним молярним надлишком DHAA (дегідроаскорбінової кислоти). Окислення міжланцюгових дисульфідних зв'язків завершувалося приблизно через три години або більше. Окислення атмосферним повітрям також було ефективним. Проводили діаліз повторно окисленого антитіла проти 20 мМ сукцинату натрію, pH 5, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA та зберігали замороженим при -20 °C.

Кон'югація ThioMab зі сполуками лікарський засіб-лінкер для отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб

Повторно окислені ThioMab, як описано вище, об'єднували з 2,5-10-кратним надлишком інтермедіату лікарський засіб-лінкер (15ba, 15bb, 15d, 58), перемішували й залишали протягом приблизно однієї години при кімнатній температурі для здійснення кон'югації та утворення

кон'югатів ThioMab антитіло-лікарський засіб 101-115, зазначених у Таблиці 1. Суміш кон'югатів очищали за допомогою гель-фільтрації, катіонообмінної хроматографії або діалізу для видалення надлишку інтермедиату лікарський засіб-лінкер та інших домішок.

Таблиця 1

ADC	ADC (Ab- лікарський засіб / лінкер)	Сполука лікарський засіб-лінкер	DAR (відношення лікарського засобу до антитіла)	Фігури
101	Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1,3	2, 3, 4
102	анти-CD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1,2	2, 3
103	Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,37	2, 3, 4
104	анти-CD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,2	2, 3
105	трастузумаб-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1	6
106	трастузумаб-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,1	6
107	анти-Steap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	0,5	4, 6
108	анти-Steap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,5	4, 6
109	анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,75	5
110	анти-CD22-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,8	5
111	анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,8	
112	gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,85	
113	gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,9	
114	трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,7	
115	трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,8	

5

Tr = тіотрастузумаб, анти-HER2, 4D5 HC A118C (Послідовна нумерація), A114C (система нумерації Kabat);

imp=N-10 імін, який містить захисну групу: 3-(2-метоксиетокси)пропаноат-Val-Ala-PAB-.

10 Зокрема, інтермедіат лікарський засіб-лінкер 15d (MW 1496,65) розчиняли в DMA (диметилацетаміді) з отриманням розчину з концентрацією 20 мМ. Повторно окислене, на основі цистеїну антитіло H118C-трастузумаб (Tr) розморожували й додавали 3-кратний молярний надлишок сполуки 15d. Після того, як експерименти показали підвищену агрегацію антитіл при більш високих значеннях pH, реакцію проводили при pH 5. За ступенем кон'югації лікарського засобу спостерігали за допомогою PX/MC аналізу. Через 3 години додавали

15 додатково 1-кратну еквівалентну кількість сполуки 15d і реакцію продовжували протягом ночі при 4 °C з отриманням технічного ADC 114.

20 Кон'югат антитіло-лікарський засіб, трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD 114, потім наносили на катіонообмінну колонку після розбавлення сукцинатом, промивали сукцинатом щонайменше 10 об'ємами колонки та елюювали ФСБ. Кон'югат антитіло-лікарський засіб 114 вводили до розчину 20 мМ His/ацетат, pH 5, 240 мМ сахарози з використанням колонки для

25 Ексклюзійну хроматографію проводили з використанням колонки Shodex KW802,5 у 0,2 М

фосфаті калію, рН 6,2, з 0,25 мМ хлоридом калію та 15 % ізопропанолу (IPA) при швидкості потоку 0,75 мл/хв. Ступінь агрегації кон'югату визначали за сумарною абсорбцією площі піка елюції при 280 нм. Дані SEC показали 4,1 % (за сумарною площею) агрегованого ADC при 8,08 хв та 95,9 % мономерного ADC 114 через 8,99 хв.

5 PX/MC аналіз проводили з використанням приладу QTOF 6520 ESI. Наприклад, трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp) PBD 114 відновлювали за допомогою ДТТ (дитіотреїтолу) й наносили на колонку PLRP-S (Varian), 1000 Å, 8 мкм, при 80 °C та елювали градієнтом 30 % В – 40 % В протягом 5 хвилин. Рухома фаза А являла собою Н₂О з 0,05 % ТФО, рухома фаза В являла собою ацетонітрил з 0,04 % ТФО. Швидкість потоку становила 0,5
10 мл/хв. За елюванням білків стежили за допомогою детектування УФ-абсорбції при 280 нм до іонізації електророзпилюванням та часопролітного (TOF) аналізу. Отримували початкове хроматографічне розділення для окремого легкого ланцюга, залишкового окремого важкого ланцюга та важкого ланцюга, пов'язаного з лікарським засобом. Отримані спектри m/z обробляли з використанням програми Agilent Mass Hunter (TM) для розрахунку маси відновлених фрагментів антитіл.

Молекулярна маса (MW) MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 58 (Фігура 1) = 1964 Дальтон

Маси, що спостерігалися після обробки:

23440 Дальтон відповідає MW окремого легкого ланцюга;

50627 Дальтон відповідає MW окремого важкого ланцюга;

20 52591 Дальтон відповідає MW важкого ланцюга, зв'язаного з лікарським засобом.

Таким чином, спостережуваний пік, який відповідає 52591 Дальтон, відповідає очікуваному фрагменту важкого ланцюга (HC) (50627 Дальтон), який містить один фрагмент лікарського засобу, інтермедіату лікарський засіб-лінкер 58 (1964 Дальтон).

Коли антитіло для кон'югування з інтермедіатом PBD лікарський засіб-лінкер являє собою
25 антитіло не на основі цистеїну, міжланцюгові дисульфідні зв'язки частково відновлюють при додаванні приблизно 2,2-молярного надлишку TCEP у фосфатному буфері рН 7,5 протягом 2 годин при 37 °C. Кожен еквівалент TCEP теоретично призводить до отримання 2 реакційноздатних цистеїнів. Як правило, для бажаного відношення лікарський засіб/антитіло (DAR), яке становить приблизно 3,5, додають 1,8-2-молярний надлишок TCEP. Після
30 відновлення, як правило, стадія очищення не потрібна. Додавали невеликий надлишок (1,2-1,5 X) інтермедіату лікарський засіб-лінкер відносно реакційноздатних цистеїнів, приблизно 8 молярних еквівалентів інтермедіату лікарський засіб-лінкер на антитіло, і реакцію проводили протягом приблизно 1 години при кімнатній температурі. Очищення може здійснюватися за допомогою діалізації, йонообмінної фільтрації або гель-фільтрації. DAR можна визначити за
35 допомогою хроматографії гідрофобних взаємодій (HIC) або PX/MC відновленого кон'югату за сумарною площею піку при 280 нм.

Аналіз клітинної проліферації *in vitro*

Ефективність ADC визначали за допомогою аналізу клітинної проліферації з використанням наступного методу (люмінесцентний аналіз виживаності клітин CellTiter Glo, Promega Corp.
40 Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

1. Аліквоту 100 мкл клітинної культури, яка містить приблизно 10⁴ клітин (наприклад, KPL-4, лінії клітин раку молочної залози людини, Kurebayashi et al (1999) Brit. Jour. Cancer 79 (5-6):707-717), SKBR-3, BT474, MCF7 або MDA-MB-468) в середовищі поміщали в кожну лунку 96-лункового непрозорого планшета.

45 2. Готували контрольні лунки, що містять середовище при відсутності клітин.

3. До лунок для випробувань додавали ADC та інкубували протягом 3-5 днів.

4. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом приблизно 30 хвилин.

5. Додавали об'єм реагента CellTiter-Glo, який дорівнює об'єму культурального середовища в кожній лунці.

50 6. Вміст лунок перемішували протягом 2 хвилин на орбітальному шейкері для індукування лізису клітин.

7. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин для стабілізації люмінесцентного сигналу.

8. Записували сигнал люмінесценції та будували графік у вигляді залежності RLU =
55 відносних одиниць люмінесценції.

Певні клітини висівали в кількості 1000-2000/лунку або 2000-3000/лунку в 96-лунковий планшет, 50 мкл/лунку. Через один або два дні додавали ADC в об'ємі 50 мкл з отриманням кінцевої концентрації 9000, 3000, 1000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1 або 1,4 нг/мл з контрольними лунками без ADC з додаванням тільки середовища. Аналізи проводили в двох або трьох
60 повторностях. Через 3-5 днів додавали 100 мкл/лунку Cell TiterGlo II (аналіз на основі

люциферази; вимірювання проліферації за рівнем АТФ) і підрахунок клітин проводили з використанням люмінометра. Дані наносили на графік як середнє значення люмінесценції для кожної серії повторів із планкою похибок стандартного відхилення. Дана методика є модифікацією люмінесцентного аналізу клітинної виживаності CellTiter Glo (Promega):

5 1. Розсівають 1000 клітин/лунку в 50 мкл на лунку середовища з додаванням ЕБС (ембріональної бичачої сироватки)/глутаміну. Дозволяють клітинам прикріпитися протягом ночі.

2. Готують послідовні розведення ADC 1:3 в середовищі, починаючи з робочої концентрації 18 мкг/мл (отже, кінцева концентрація становить 9 мкг/мл). 50 мкл розведеного ADC додають до 10 50 мкл клітин і середовища, які присутні в лунці.

3. Інкують протягом 72-96 годин (за методикою 72 години, але потрібно відстежувати концентрацію 0 мкг/мл, щоб закінчити аналіз, коли клітини досягають 85-95 % моношару).

4. Додавали 100 мкл/лунку реагента Promega Cell Titer Glo, перемішували протягом 3 хвилин і аналізували на люмінометрі.

15 Результати

На Фігурі 2 показаний графік залежності виживаності клітин SK-BR-3 *in vitro* за 5 днів від концентрації: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 101 (●), анти-CD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 102 (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 103 (◆) і анти-CD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 104, де Tr являє собою анти-HER2 тіотрастузумаб 4D5 HC A118C; нумерацію мутантних важких ланцюгів антитіл, сконструйованих на основі цистеїну, приводили відповідно до схеми послідовної нумерації.

Проліферація клітин SK-BR-3, що експресують HER2, селективно придушується кон'югатами антитіло до HER2-лікарський засіб 101 і 103, але не придушується кон'югатами антитіло до CD22-лікарський засіб 102 і 104. Зазначені результати підтверджують залежний від мішені селективний цитотоксичний ефект *in vitro* PBD кон'югату антитіло-лікарський засіб.

На Фігурі 3 показаний графік залежності виживаності клітин KPL-4 *in vitro* за 5 днів від концентрацій: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 101 (●), анти-CD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 102 (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 103 (◆) і анти-CD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 104 (▼), де Tr являє собою анти-HER2 тіотрастузумаб 4D5 HC A118C; нумерацію мутантних важких ланцюгів антитіл, сконструйованих на основі цистеїну, приводили відповідно до схеми Послідовної нумерації.

Кон'югати антитіло-лікарський засіб, трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD 114 і трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 115, аналізували на клітинах SK-BR-3, KPL-4 і MCF-7 (Levenson et al (1997) Cancer Res. 57 (15):3071-3078) для вимірювання виживаності клітин *in vitro* в 5-денних дослідженнях. Значення IC₅₀ (мкг/мл) для 114 для клітин SK-BR-3 становило 17,2, а для клітин KPL-4 становило 68,1. Значення IC₅₀ для 115 для клітин SK-BR-3 становило 12,3, а для клітин KPL-4 становило 50,7. Як 114, так і 115 не були ефективними стосовно клітин лінії MCF-7, яка являє собою лінію клітин аденокарциноми раку молочної залози людини, які не експресують HER2. Таким чином, кон'югати 114 і 115 демонстрували спрямовану цитотоксичну активність.

Придушення росту пухлини, ефективність *in vivo* в трансгенних мишах, які містять експлантат із підвищеною експресією HER2

Тварини, підходящі для трансгенних експериментів, можуть бути отримані зі стандартних комерційних джерел, таких як Taconic (Германтаун, Нью-Йорк). Багато ліній є підходящими, але 45 самки мишей FVB є переважними через більш високу схильність до утворення пухлини. Самців FVB використовували для спаровування і вазектомованих самців CD, 1 використовували для стимуляції псевдовагітності. Вазектомовані миші можуть бути отримані з будь-якого комерційного джерела. Засновників схрещували або з мишами FVB, або з гетерозиготними мишами 129/BL6 x FVB p53. Мишей, гетерозиготних за алеллю p53, використовували для 50 можливого прискорення утворення пухлини, що, однак, виявилось необов'язковим. Таким чином, деякі пухлини F1 є пухлинами змішаного походження. Пухлини засновників мають тільки FVB-походження. Було отримано шість тварин-засновників, які не мають потомства, з декількома пухлинами, що розвиваються.

Тварин, що містять пухлини (алогенний трансплантат, отриманий із трансгенних мишей Fo5 mmtv), лікували однократною чи багаторратною дозою внутрішньовенної ін'єкції ADC. Об'єм пухлини оцінювали в різні моменти часу після ін'єкції.

Пухлини швидко утворюються в трансгенних мишах, які експресують активовану мутагенезом форму неврїлеми, щурячого гомолога HER2, але HER2, який гіперекспресується в раковій пухлині молочної залози людини, не є мутованим, і у трансгенних мишей, у яких гіперекспресується немутована форма HER2, утворення пухлини набагато менш інтенсивне

(Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76).

Для прискорення утворення пухлини, яка експресує немутовану форму HER2, отримували трансгенних мишей із використанням плазмиди, яка містить кДНК HER2, в якій вищерозташований ATG був видалений для запобігання ініціації трансляції таких вищерозташованих ATG-кодонів, яка в протилежному випадку призводила б до зниження частоти ініціації трансляції з аутентичного старт-кодону HER2 (наприклад, див., Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341). Крім того, до 5'-кінця додавали гібридний інтрон, який також повинен підвищувати рівень експресії, як описано раніше (Neuberger and Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16:6713; Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 4395; Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836). Гібридний інтрон був отриманий із вектора експресії ссавців Pci-neo (bp 890-1022), Promega. 3'-кінець кДНК був фланкований екзонами гормону росту людини 4 та 5 і послідовностями поліаденілювання. Більше того, використовували мишей лінії FVB, оскільки вказана лінія є більш чутливою до розвитку пухлини. Для забезпечення тканинносPECIFIC експресії HER2 в молочній залозі використовували промотор із MMTV-LTR. Тварин утримували на дієті AIN 76A для підвищення схильності до пухлиноутворення (Rao et al (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

Мишача модель пухлини молочної залози Fo5

Модель Fo5 являє собою модель трансгенних мишей, у якій людський ген HER2 під регуляцією транскрипції промотора вірусу пухлини молочної залози мишей (MMTV-HER2) гіперекспресується в епітелії молочної залози. Гіперекспресія викликає спонтанний розвиток пухлин молочної залози, які гіперекспресують людський рецептор HER2. Пухлину молочної залози однієї з тварин-засновників (засновник № 5 [Fo5]) розвивали в наступних поколіннях мишей лінії FVB шляхом серійних трансплантацій фрагментів пухлини. До використання в дослідженні ефективності *in vivo* трансгенну пухлину молочної залози MMTV-HER2 Fo5 хірургічним шляхом трансплантували в жирове тіло молочної залози No. 2/3 мишей лінії nu/nu (отриманих із Charles River laboratories) у вигляді фрагментів розміром приблизно 2 × 2 мм. Коли пухлини досягали бажаних об'ємів, мишей, що містять пухлини, розподіляли по групах випадковим чином і вводили одноразову дозу ADC шляхом внутрішньовенної ін'єкції.

Результати

На Фігурі 4 показаний графік залежності середньої зміни об'єму пухлини *in vivo* від часу в моделі раку молочної залози, викликаного алогенними пухлинами молочної залози MMTV-HER2 Fo5, які інокулювали мишам nu/nu CRL, після одноразового внутрішньовенного введення в 0 день дози: (1) плацебо (20 мМ гістидинацетат, pH 5,5, 240 мМ сахароза), (2) анти-Steap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 107 у дозі 10 мг/кг, (3) анти-Steap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 108 у дозі 10 мг/кг, (4) Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 101 у дозі 10 мг/кг і (5) Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD 103 у дозі 10 мг/кг. Лінії на Фігурі позначені наступними символами:

—×— Плацебо

—+— 107

—⊕— 108

—○— 101

—□— 103

Анти-HER2 кон'югати 101 і 103 показали спрямоване придушення пухлинного росту. З 10 тварин, яких лікували кон'югатом 101, дві показали часткові відповіді. З 10 тварин, яких лікували кон'югатом 103, три показали часткові відповіді. Неспрямовані дози ADC 107 і 108 як контрольні не впливали на ріст пухлини.

У іншому наведеному як приклад дослідженні середню зміну об'єму пухлини *in vivo* в залежності від часу в моделі раку молочної залози, викликаного алогенними пухлинами молочної залози MMTV-HER2 Fo5, які інокулювали мишам лінії nu/nu CRL, вимірювали після одноразового внутрішньовенного введення в 0 день дози: (1) плацебо (20 мМ гістидинацетат, pH 5,5, 240 мМ сахароза); (2) 112 gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD в дозі 5 мг/кг (доза ADC), 300 мкг/м² (вплив PBD лікарського засобу); (3) 112 gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD в дозі 10 мг/кг, 600 мкг/м²; (4) 114 трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD в дозі 5 мг/кг, 284 мкг/м²; (5) 114 трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD в дозі 10 мг/кг, 569 мкг/м²; (6) 113 gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD в дозі 10 мг/кг, 807 мкг/м²; і (7) 115 трастузумаб-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD в дозі 10 мг/кг, 790 мкг/м². Розмір пухлини вимірювали на 0, 3, 7 та 10 день. Через 10 днів у тварин, яким вводили дозу: (1) плацебо, спостерігали збільшення розміру пухлини і не спостерігали придушення в групі з 10 тварин; (2) 112, не спостерігали часткової чи повної відповіді в групі з 10 тварин; (3) 112, не спостерігали часткової чи повної відповіді в групі

з 10 тварин; (4) 114, спостерігали дев'ять часткових відповідей у групі з 10 тварин; (5) 114, спостерігали десять часткових відповідей у групі з 10 тварин; (6) 113, не спостерігали часткової чи повної відповіді в групі з 10 тварин; і (7) 115, спостерігали десять часткових відповідей у групі з 10 тварин. Таким чином, ADC 114 і 115, спрямовані проти HER2, показали спрямоване придушення пухлини, тоді як негативний контроль плацебо і неспрямовані ADC 112 і 113 не показали зазначеного придушення.

LuCar35V модель пухлини передміхурової залози людини

LuCar35V, отримана з університету Вашингтона (Сіетл, Вашингтон), являє собою андроген-незалежний варіант моделі експлантованої пухлини передміхурової залози людини LuCar35 (Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCar35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence. *The Prostate* 2003; 55:239-46). Тканину, яку використовували для розвитку LuCar35, виділяли з матеріалу біопсії пахових лімфатичних вузлів з метастатичним раком передміхурової залози і потім імплантували в бік мишей (Corey et al. 2003). Модель експлантованої пухлини LuCar35V підтримували шляхом здійснення серійних імплантацій стерилізованим самцям мишей лінії Fox Chase SCID C.B-17 протягом 38 пасажів в Університеті Вашингтона і потім стерилізованим самцям бежевих мишей SCID C.B-17, отриманих із Charles River Laboratories, протягом безперервних пасажів в корпорації Genentech. До використання в дослідженні ефективності *in vivo* частини пухлини LuCar35V (приблизно 20-30 мм³) підшкірно імплантували в правий бік стерилізованих самців бежевих мишей SCID C.B-17. Тварин стерилізували за 2 тижні до імплантації пухлини для забезпечення періоду часу для зниження залишкового рівня тестостерону до нуля. Коли пухлини досягали бажаних об'ємів, мишей, що містять пухлини, випадковим чином розподіляли по групах і вводили одноразову дозу ADC шляхом внутрішньовенної ін'єкції.

Результати

На Фігурі 5 показаний графік залежності середньої зміни об'єму пухлини *in vivo* від часу в моделі раку передміхурової залози, викликаного ксенотрансплантантами пухлинами LuCar35V у стерилізованих самців бежевих мишей SCID, після одноразового внутрішньовенного введення в 0 день дози: (1) плацебо (20 мМ гістидинацетат, pH 5,5, 240 мМ сахароза) (▲), (2) анти-CD22-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 110 у дозі 5 мг/кг (●), і (3) анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 109 у дозі 5 мг/кг (■).

На Фігурі 6 показаний графік середньої зміни об'єму пухлини *in vivo* від часу в моделі раку передміхурової залози, викликаного ксенотрансплантантами пухлинами LuCar35V у стерилізованих самців бежевих мишей лінії SCID, після одноразового внутрішньовенного введення в 0 день дози: (1) плацебо (20 мМ гістидинацетат, pH 5,5, 240 мМ сахароза) (▲), (2) 107 анти-Steap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 9,8 мг/кг, 60 мкг/м² (■), (3) 107 анти-Steap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 19,5 мг/кг, 120 мкг/м² (●), (4) 108 анти-Steap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 3,3 мг/кг, 60 мкг/м² (□), (5) 108 анти-Steap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 6,5 мг/кг, 120 мкг/м² (○), (6) 105 трастузумаб-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 9,4 мг/кг, 120 мкг/м² (◆) і (7) 106 трастузумаб-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 8,6 мг/кг (доза ADC), 120 мкг/м² (вплив PBD лікарського засобу) (X).

У іншому наведеному як приклад дослідженні середню зміну об'єму пухлини *in vivo* в залежності від часу в моделі раку передміхурової залози, викликаного ксенотрансплантантами пухлинами LuCar35V у стерилізованих самців бежевих мишей SCID, визначали після одноразового внутрішньовенного введення в 0 день дози: (1) плацебо (20 мМ гістидинацетат, pH 5,5, 240 мМ сахароза), (2) 112 gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 мг/кг (доза ADC), 68,3 мкг/м² (експозиція PBD лікарського засобу), (3) 111 анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 1 мг/кг, 22,15 мкг/м², (4) 111 анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 мг/кг, 66,4 мкг/м², (5) 113 gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD, 3 мг/кг, 70,1 мкг/м², і (6) 109 анти-Steap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 3 мг/кг, 64,6 мкг/м². Розмір пухлини вимірювали кожні 4 дні. Через 27 днів у тварин, яким вводили дозу: (1) плацебо, спостерігали збільшення розміру пухлини і не спостерігали придушення пухлини в групі з 8 тварин; (2) 112, спостерігали одну часткову відповідь у групі з 8 тварин; (3) 111, спостерігали чотири часткові відповіді та чотири повні відповіді в групі з 6 тварин; (4) 111, спостерігали п'ять часткових відповідей і три повні відповіді в групі з 5 тварин; (5) 113, не спостерігали часткових чи повних відповідей у групі з 8 тварин; і (6) 109, спостерігали сім часткових відповідей і одну повну відповідь у групі з 7 тварин. Спрямовані проти Steap1 сполуки ADC 109 і 111 показали спрямоване придушення пухлини, тоді як негативний контроль плацебо і неспрямовані сполуки ADC 112 і 113 не показали зазначеного придушення.

Скорочення

Ас ацетил

	Асм ацетамідометил
	Алос алілоксикарбоніл
	Вос ди-трет-бутилдикарбонат
	t-Bu трет-бутил
5	Bzl бензил, де Bzl-ОМе являє собою метоксибензил, а Bzl-Ме являє собою метилбензол
	Cbz або Z бензилоксикарбоніл, де Z-Cl і Z-Br являють собою хлор- і
	бромбензилоксикарбоніл відповідно
	ДМФА N, N-диметилформамід
	Dnp динітрофеніл
10	ДТТ дитіотреїтол
	Fmoc 9N-флуорен-9-ілметоксикарбоніл
	іmp захисна група N-10 імінної групи: 3-(2-метоксиетокси)пропаноат-Val-Ala-PAB
	MC-OSu малеїмідокапроїл-O-N-сукцинімід
	Moc метоксикарбоніл
15	MP малеїмідопропанамід
	Mtr 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфоніл
	PAB пара-амінобензилоксикарбоніл
	PEG етиленокси
	PNZ п-нітробензилкарбамат
20	Psec 2-(фенілсульфоніл)етоксикарбоніл
	TBDMS трет-бутилдиметилсіліл
	TBDPS трет-бутилдифенілсіліл
	Teos 2-(триметилсіліл)етоксикарбоніл
	Tos тозил
25	Troc 2,2,2-трихлоретоксикарбонілхлорид
	Trt тритил
	Хап ксантил
	Посилання
	Наступні посилання повністю включені за допомогою посилання:
30	EP 0522868
	EP 0875569
	EP 1295944
	EP 1347046
	EP 1394274
	EP 1394274
	EP 1439393
	JP 05003790
	JP 2004113151
	JP 58180487
	US 2001/055751
	US 2002/034749
	US 2002/042366
	US 2002/150573
	US 2002/193567
	US 2003/0228319
	US 2003/060612
	US 2003/064397
	US 2003/065143
	US 2003/091580
	US 2003/096961
	US 2003/105292
	US 2003/109676
	US 2003/118592
	US 2003/119121
	US 2003/119122
	US 2003/119125
	US 2003/119126
	US 2003/119128
	US 2003/119129

US 2003/119130
 US 2003/119131
 US 2003/124140
 US 2003/124579
 US 2003/129192
 US 2003/134790-A 1
 US 2003/143557
 US 2003/157089
 US 2003/165504
 US 2003/185830
 US 2003/186372
 US 2003/186373
 US 2003/194704
 US 2003/206918
 US 2003/219806
 US 2003/224411
 US 2003/224454
 US 2003/232056
 US 2003/232350
 US 20030096743
 US 20030130189
 US 2003096743
 US 2003130189
 US 2004/0001827
 US 2004/005320
 US 2004/005538
 US 2004/005563
 US 2004/005598
 US 2004/0101899
 US 2004/018553
 US 2004/022727
 US 2004/044179
 US 2004/044180
 US 2004/101874
 US 2004/197325
 US 2004/249130
 US 20040018194
 US 20040052793
 US 20040052793
 US 20040121940
 US 2005/271615
 US 2006/116422
 US 4816567
 US 5362852
 US 5440021
 US 5583024
 US 5621002
 US 5644033
 US 5674713
 US 5700670
 US 5773223
 US 5792616
 US 5854399
 US 5869445
 US 5976551
 US 6011146
 US 6153408
 US 6214345
 US 6218519
 US 6268488

US 6518404
US 6534482
US 6555339
US 6602677
US 6677435
US 6759509
US 6835807
US 7223837
US 7375078
US 7521541
US 7723485
WO 00/012508
WO 00/12507
WO 00/12508
WO 01/16318
WO 01/45746
WO 02/088172
WO 03/026577
WO 03/043583
WO 04/032828
WO 2000/12130
WO 2000/14228
WO 2000/20579
WO 2000/22129
WO 2000/32752
WO 2000/36107
WO 2000/40614
WO 2000/44899
WO 2000/55351
WO 2000/75655
WO 200053216
WO 2001/00244
WO 2001/38490
WO 2001/40269
WO 2001/40309
WO 2001/41787
WO 2001/46232
WO 2001/46261
WO 2001/48204
WO 2001/53463
WO 2001/57188
WO 2001/62794
WO 2001/66689
WO 2001/72830
WO 2001/72962
WO 2001/75177
WO 2001/77172
WO 2001/88133
WO 2001/90304
WO 2001/94641
WO 2001/98351
WO 2002/02587
WO 2002/02624
WO 2002/06317
WO 2002/06339
WO 2002/101075
WO 2002/10187
WO 2002/102235
WO 2002/10382
WO 2002/12341

WO 2002/13847
WO 2002/14503
WO 2002/16413
WO 2002/16429
WO 2002/22153
WO 2002/22636
WO 2002/22660
WO 2002/22808
WO 2002/24909
WO 2002/26822
WO 2002/30268
WO 2002/38766
WO 2002/54940
WO 2002/59377
WO 2002/60317
WO 2002/61087;
WO 2002/64798
WO 2002/71928
WO 2002/72596
WO 2002/78524
WO 2002/81646
WO 2002/83866
WO 2002/86443
WO 2002/88170
WO 2002/89747
WO 2002/92836
WO 2002/94852
WO 2002/98358
WO 2002/99074
WO 2002/99122
WO 2003/000842
WO 2003/002717
WO 2003/003906
WO 2003/003984
WO 2003/004989
WO 2003/008537
WO 2003/009814
WO 2003/014294
WO 2003/016475
WO 2003/016494
WO 2003/018621
WO 2003/022995
WO 2003/023013
WO 2003/024392
WO 2003/025138
WO 2003/025148
WO 2003/025228
WO 2003/026493
WO 2003/029262
WO 2003/029277
WO 2003/029421
WO 2003/034984
WO 2003/035846
WO 2003/042661
WO 2003/045422
WO 2003/048202
WO 2003/054152
WO 2003/055439
WO 2003/055443
WO 2003/062401

WO 2003/062401
WO 2003/072035
WO 2003/072036
WO 2003/077836
WO 2003/081210
WO 2003/083041
WO 2003/083047
WO 2003/083074
WO 2003/087306
WO 2003/087768
WO 2003/088808
WO 2003/089624
WO 2003/089904
WO 2003/093444
WO 2003/097803
WO 2003/101283
WO 2003/101400
WO 2003/104270
WO 2003/104275
WO 2003/105758
WO 2003004529
WO 2003042661
WO 2003104399
WO 2004/000997
WO 2004/001004
WO 2004/009622
WO 2004/011611
WO 2004/015426
WO 2004/016225
WO 2004/020595
WO 2004/022709
WO 2004/022778
WO 2004/027049
WO 2004/031238
WO 2004/032828
WO 2004/032842
WO 2004/040000
WO 2004/043361
WO 2004/043963
WO 2004/044178
WO 2004/045516
WO 2004/045520
WO 2004/045553
WO 2004/046342
WO 2004/047749
WO 2004/048938
WO 2004/053079
WO 2004/063355
WO 2004/063362
WO 2004/063709
WO 2004/065577
WO 2004/074320
WO 2004000221
WO 2004020583
WO 2004042346
WO 2004065576
WO 2005/023814
WO 2005/082023
WO 2005/085251
WO 2006/111759

WO 2007/044515
 WO 2007/085930
 WO 2009/052249
 WO 2010/091150
 WO 91/02536
 WO 92/07574
 WO 92/17497
 WO 94/10312
 WO 94/28931
 WO 9630514
 WO 97/07198
 WO 97/44452
 WO 98/13059
 WO 98/37193
 WO 98/40403
 WO 98/51805
 WO 98/51824
 WO 99/28468
 WO 99/46284
 WO 99/58658

Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)
 Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996
 Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499
 Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867
 Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186
 Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998)
 Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993
 Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992
 Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)
 Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995
 Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996
 Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998
 Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779
 Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988
 Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441
 Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13
 Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999)
 Blood (2002) 100 (9):3068-3076
 Blood 99 (8):2662-2669 (2002)
 Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001
 Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)
 Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997
 Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836
 Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395
 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)
 Carl et al (1981) J. Med. Chem. 24:479-480
 Carlsson et al (1978) Biochem. J. 173:723-737
 Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357
 Cell 109 (3):397-407 (2002)
 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288
 Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644
 Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991)
 Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341

- Cho H.-S., et al *Nature* 421, 756-760, 2003
- Ciccodicola, A., et al *EMBO J.* 8(7):1987-1991 (1989)
- Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628
- Clark H.F., et al *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003
- Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence. *The Prostate* 2003;55:239-46
- Coussens L., et al *Science* (1985) 230(4730):1132-1139
- Cree et al (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404
- Crouch et al (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88
- Davis et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(17):9772-9777
- de Groot et al (2001) *J. Org. Chem.* 66:8815-8830
- de Groot et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494
- Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043
- Dobner et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799
- Dornan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729
- Doronina et al (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124
- Dubowchik et al. *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869
- Dubowchik, et al. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60
- Dumoutier L., et al *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001
- E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press
- Ehsani A., et al (1993) *Genomics* 15, 426-429
- Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994
- Elshourbagy N.A., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993
- Erickson et al (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8
- Feild, J.A., et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582
- Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214
- Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001
- Fujisaku et al (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125
- Gary S.C., et al *Gene* 256, 139-147, 2000
- Gaugitsch, H.W., et al (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273
- Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218
- Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003)
- Genomics* 62 (2):281-284 (1999)
- Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146
- Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80
- Glynne-Jones et al (2001) *Int J Cancer.* Oct 15; 94(2):178-84
- Gregson et al., *Chem. Commun.* 1999, 797-798
- Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 1161-1174
- Gu Z., et al *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000
- Ha et al (1992) *J. Immunol.* 148(5):1526-1531
- Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992
- Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103
- Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070
- Handbook of Pharmaceutical Additives*, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA)
- Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd edition, 1994
- Hara, et al., *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988)
- Hashimoto et al (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295
- Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237
- Herdwijn, P. et al., *Canadian Journal of Chemistry.* 1982, 60, 2903-7
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p 234-242
- Hochlowski, et al., *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)

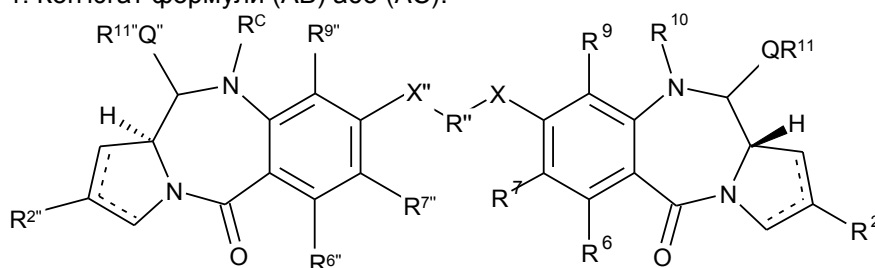
- Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997
Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996
Horie et al (2000) *Genomics* 67:146-152
Hubert, R.S., et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528
Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)
Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002)
Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)
Itoh, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)
J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)
J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)
J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002)
J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)
Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York
Jeffrey et al (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358
Jonsson et al (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413
Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932
Kang, G-D., et al., *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689
Kasahara et al (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68
King et al (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990
Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447
Kohler et al (1975) *Nature* 256:495
Kohn, in *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975).
Konishi, et al., *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)
Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121
Kuhns J.J., et al *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999
Kuminoto, et al., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)
Kurebayashi et al (1999) *Brit. Jour. Cancer* 79(5-6):707-717
Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)
Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549
Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)
Larhammar et al (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337
Le et al (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199
Leber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)
Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)
Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965)
Levenson et al (1997) *Cancer Res.* 57(15):3071-3078
Liang et al (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12
Manfré, F. et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065
Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597
McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.*, 19(7): 299-307
Mendoza et al (2002) *Cancer Res.* 62:5485-5488
Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861
Miura et al (1996) *Genomics* 38(3):299-304
Miura et al (1998) *Blood* 92:2815-2822
Moore M., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987
Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855
Muller et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625
Mungall A.J., et al *Nature* 425, 805-811, 2003
Nagase T., et al (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150
Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991
Nakayama et al (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127
Naruse et al (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519
Nature 395 (6699):288-291 (1998)

Neuberger and Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713
 Novabiochem Catalog 2006/2007
 Ogawa Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991
 Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997
Oncogene 10 (5):897-905 (1995)
Oncogene 14(11):1377-1382 (1997)
 Parrish-Novak J., et al *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002
 Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212
 Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206
 Pletnev S., et al (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624
 Preud'homme et al (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999)
Protective Groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts, 3rd Edition, 1999, John Wiley & Sons Inc.
 Puffenberger E.G., et al *Cell* 79, 1257-1266, 1994
 Rao et al (1997) *Breast Cancer Res. and Treatment* 45:149-158
 Reiter R.E., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998
Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000
 Rodrigues et al (1995) *Chemistry Biology* 2:223
 Ross et al (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553
 S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York
 Sakaguchi et al (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464
 Sakamoto A., Yanagisawa M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991
 Sanderson et al (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852
 Semba K., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985
 Servenius et al (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766
 Shamis et al (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126:1726-1731
 Sheikh F., et al (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010
 Shimizu, et al, *J. Antibiotics*, 29, 2492-2503 (1982)
 Sinha S.K., et al (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320
 Storm et al (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815
 Strausberg et al (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903
 Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215
 Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768
 Svensson P.J., et al *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998
 Swiercz J.M., et al *J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004
 Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614
 Takeuchi, et al., *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)
 Tawaragi Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988
 ten Dijke, P., et al *Science* 264 (5155):101-104 (1994)
 Thompson, J.S., et al *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001) WO 2004/058309
 Thurston, et al., *Chem. Brit.*, 26, 767-772 (1990)
 Thurston, et al., *Chem. Rev.* 1994, 433-465 (1994)
 Toki et al (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872
 Tonnelle et al (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847
 Touchman et al (2000) *Genome Res.* 10:165-173
 Trail et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337
 Tsunakawa, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1366-1373 (1988)
 Tsutsumi M., et al *Gene* 228, 43-49, 1999

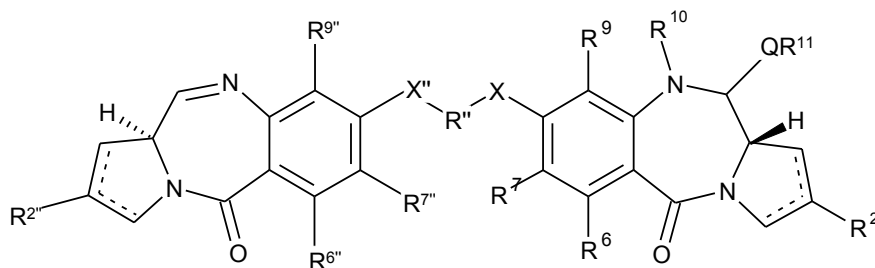
- Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602
 Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002
 Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877
 Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76
 Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988
 Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986
 Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146
 Wu et al (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145
 Xie et al (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291
 Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775 WO 2004/016225
 Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001)
 Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994)
 Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986
 Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Кон'югат формули (AB) або (AC):



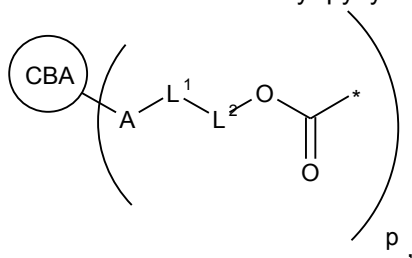
AB



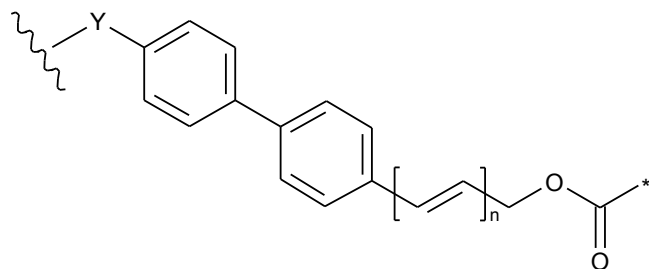
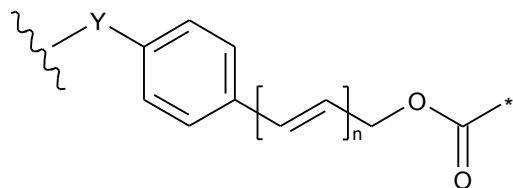
AC

та його солі і сольвати, де:

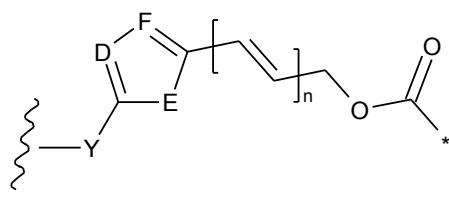
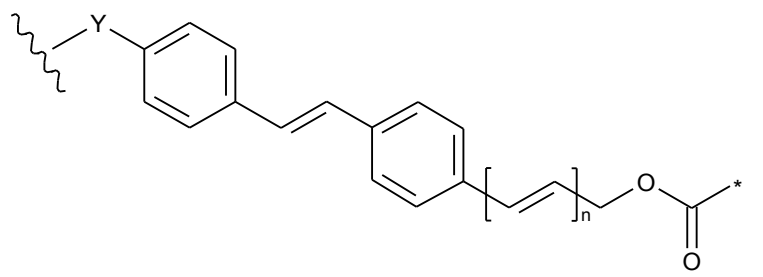
- 10 пунктирні лінії означають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2 або C2 і C3;
 R² незалежно вибраний з =CH₂, C₁₋₆алкілу або фенілу, необов'язково заміщеного ОС₁₋₆алкілом або галогеном;
 R⁶ і R⁹ являють собою H;
 R⁷ являє собою ОС₁₋₆алкіл;
 R¹⁰ являє собою вказану групу



де зірочка означає місце приєднання до положення N10, р приймає значення від 1 до 8, L^1 являє собою дипептид, L^2 являє собою ковалентний зв'язок або утворює з $OC(=O)$ -групу, вибрану з



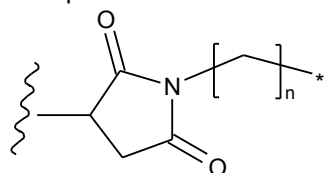
5



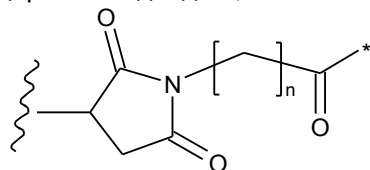
де
зірочка означає місце приєднання до положення N10,
хвиляста лінія означає місце приєднання до L^1 ,
Y являє собою -N(H)-, -O-, -C(=O)N(H)- або -C(=O)O-,
n дорівнює від 0 до 3;
E являє собою O, S або NR,
D являє собою N, CH або CR, i
F являє собою N, CH або CR;
A вибраний з

10

15

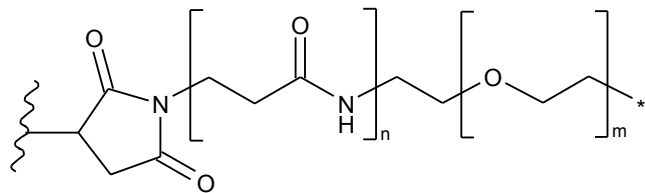


де зірочка означає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія означає місце приєднання до CBA, i n дорівнює від 0 до 6,

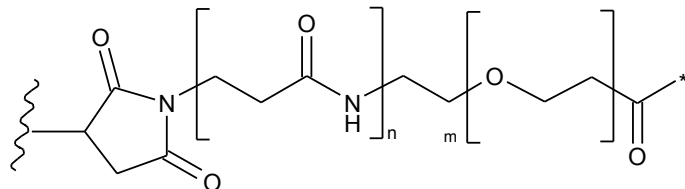


20

де зірочка означає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія означає місце приєднання до CBA, i n дорівнює від 0 до 6,



де зірочка означає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія означає місце приєднання до СВА, n дорівнює від 0 до 1, і m приймає значення від 0 до 30,



- 5 де зірочка означає місце приєднання до L^1 , хвиляста лінія означає місце приєднання до СВА, n дорівнює від 0 до 1, і m приймає значення від 0 до 30;
 СВА являє собою антитіло, яке зв'язується з одним або більше пухлиноасоційованими антигенами або рецепторами клітинної поверхні, вибраними із (1)-(36):
- 10 (1) BMPR1B (рецептор кісткового морфогенетичного білка типу IB);
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
 (3) STEAP1 (антиген епітеліальних клітин передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами);
 (4) 0772P (CA125, MUC16);
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакаріоцит-потенціюючий фактор, мезотелін);
 15 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT11b, SLC34A2, сімейство носіїв розчинених речовин 34 (фосфат натрію), член 2, тип II, натрійзалежний фосфатний транспортер 3b);
 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, сема-
 домен, що містить сім тромбоспондинових повторів (1 типу і подібний 1 типу), трансмембранний
 домен (TM) і короткий цитоплазматичний домен (семафорин) 5B);
 20 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN κДНК 2700050C12, RIKEN κДНК
 2700050C12 ген);
 (9) ETBR (рецептор ендотеліну типу B);
 (10) MSG783 (RNF124, гіпотетичний білок FLJ20315);
 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, асоційований з раком
 25 передміхурової залози ген 1, асоційований з раком передміхурової залози білок 1, антиген
 епітеліальних клітин передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами 2, білок
 передміхурової залози з шістьма трансмембранними сегментами);
 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катіонний канал транзитного рецепторного
 потенціалу, підсімейство M, член 4);
 30 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор росту тератокарциномного походження);
 (14) CD21 (CR2 (рецептор комплементу 2) або C3DR (C3d/рецептор вірусу Епштейна-Барра),
 або Hs 73792);
 (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (імуноглобулінасоційований бета), B29);
 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (що містить SH2-домен фосфатазний якірний білок Ia),
 35 SPAP1B, SPAP1C);
 (17) HER2;
 (18) NCA;
 (19) MDP;
 (20) IL20Rα;
 40 (21) Бревікан;
 (22) EphB2R;
 (23) ASLG659;
 (24) PSCA;
 (25) GEDA;
 45 (26) BAFF-R (рецептор фактора активації В-клітин, рецептор BLyS3, BR3);
 (27) CD22 (В-клітинний рецептор CD22-В ізоформи);
 (28) CD79a (CD79A, CD79α, імуноглобулінасоційований альфа);
 (29) CXCR5 (рецептор лімфоми Беркітта 1);

- (30) HLA-DOB (бета-субодиниця молекули MHC II класу (Ia антиген));
 (31) P2X5 (пуринергічний рецептор P2X, лігандзалежний іонний канал 5);
 (32) CD72 (антиген В-клітинного диференціювання CD72, Lyb-2);
 (33) LY64 (антиген лімфоцитів 64 (RP105), мембранний білок сімейства збагачених лейцином повторів (LRR) типу I);
 (34) FcRHL (подібний Fc-рецептору білок 1);
 (35) IRTA2 (рецептор імуноглобулінового суперсімейства, асоційований з транслокацією 2); і
 (36) TENB2 (передбачуваний трансмембранний протеоглікан);

Q незалежно вибраний з O, S і NH;

R¹¹ являє собою H;

кожний R і R' являє собою C₁₋₁₂алкіл, необов'язково заміщений однією або більше групами, вибраними із R, OR, SR, NRR', NO₂, галогену, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR, CONRR', C₃₋₂₀гетероциклілу й C₅₋₂₀арилу;

R'' являє собою C₃₋₁₂алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним або більше гетероатомами, наприклад O, S, N(H), NMe, та/або ароматичними кільцями, наприклад бензольним або піридиновим, при цьому зазначені кільця необов'язково містять як замісник NH₂;

кожний X являє собою O; і

де R², R⁶, R⁷, R⁹, X, Q і R¹¹ є такими, як визначено для R², R⁶, R⁷, R⁹, X, Q і R¹¹, відповідно, і R^C являє собою карбаматну захисну групу.

2. Кон'югат за п. 1, де L¹ здатний до розщеплення під дією ферментів.

3. Кон'югат за п. 2, де L¹ містить дипептид, а група -X₁-X₂- у дипептиді -NH-X₁-X₂-CO- вибрана з:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-,

-Phe-Cit-,

-Leu-Cit-,

-Ile-Cit-,

-Phe-Arg-,

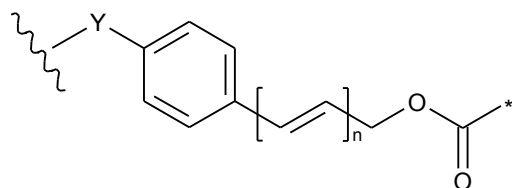
-Trp-Cit-.

4. Кон'югат за п. 3, де група -X₁-X₂- у дипептиді -NH-X₁-X₂-CO- являє собою -Phe-Lys-, -Val-Ala- або -Val-Cit-.

5. Кон'югат за будь-яким із пп. 3 або 4, де група X₂-CO- зв'язана з L², і де група NH-X₁- зв'язана з A.

6. Кон'югат за будь-яким із пп. 3-5, де L² разом із OC(=O) утворює лінкер, що саморозщеплюється.

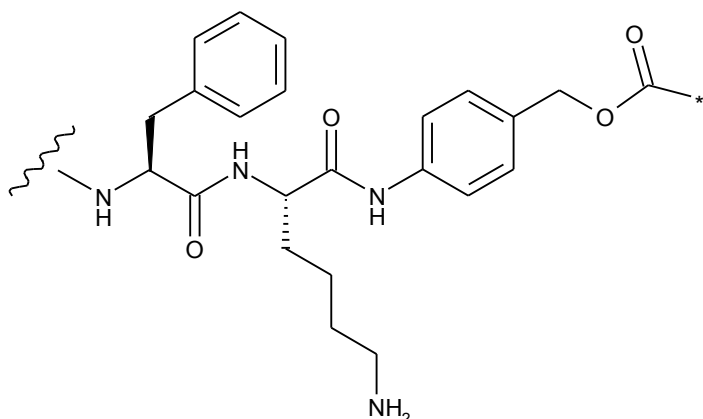
7. Кон'югат за п. 6, де C(=O)O та L² разом утворюють групу:



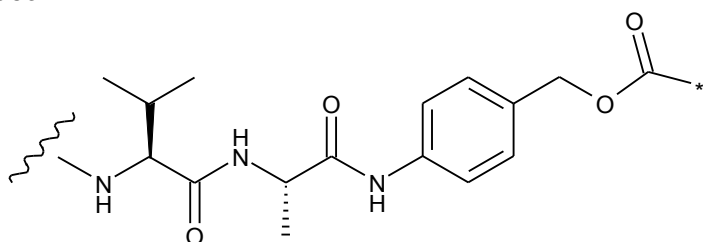
де зірочка означає місце приєднання до положення N10, хвиляста лінія означає місце приєднання до лінкера L¹, Y являє собою NH, O, C(=O)NH або C(=O)O, і n дорівнює від 0 до 3.

8. Кон'югат за п. 7, де Y являє собою NH, і n дорівнює 0.

9. Кон'югат за п. 1, де L¹ і L² разом із -OC(=O)- утворюють групу, вибрану з:



або

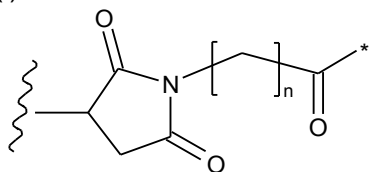


5

де зірочка означає місце приєднання до положення N10, і хвиляста лінія означає місце приєднання до А.

10. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-9, де А являє собою:

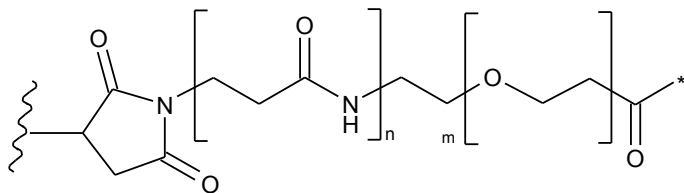
(i)



10

де зірочка означає місце приєднання до L¹, хвиляста лінія означає місце приєднання до агента, що зв'язується з клітинами, і n дорівнює від 0 до 6; або

(ii)



15

де зірочка означає місце приєднання до L¹, хвиляста лінія означає місце приєднання до агента, що зв'язується з клітинами, n дорівнює 0 або 1, і m дорівнює від 0 до 30.

11. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-10, де агент, що зв'язується з клітинами, з'єднаний з А через тіоефірний зв'язок, утворений між тіоловим залишком цистеїну в агенті, що зв'язується з клітинами, і малеїмідною групою в А.

12. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-11, де R⁷ незалежно являє собою ОМе.

20

13. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-12, де пунктирні лінії означають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C2 і C3.

14. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-13, де R² незалежно являє собою =CH₂.

15. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-13, де R² являє собою феніл, необов'язково заміщений ОС₁-алкіл або галоген.

25

16. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-15, де Rⁿ являє собою C₃алкіленову групу або C₅алкіленову групу.

17. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-16, де R^C здатний видалятися з положення N10 з утворенням N10-C11 імінного зв'язку.

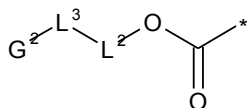
18. Кон'югат за п. 17, де R^C являє собою карбаматну захисну групу, вибрану з:

Алос,

Fmoc,
Boc,
Troc,
Teoc,
Psec,
Cbz,
PNZ.

5

19. Кон'югат за п. 17, де R^C являє собою групу:



10 де зірочка означає місце приєднання до положення N10, G^2 являє собою кінцеву групу, L^3 являє собою ковалентний зв'язок або здатний до розщеплення лінкер L^1 , L^2 являє собою ковалентний зв'язок або разом із $OC(=O)$ утворює лінкер, що саморозщеплюється.

20. Кон'югат за п. 19, де L^3 являє собою здатний до розщеплення лінкер L^1 за будь-яким із пп. 2-5.

15 21. Кон'югат за п. 19 або п. 20, де L^2 разом із $OC(=O)$ утворює лінкер, що саморозщеплюється, і зазначений лінкер, що саморозщеплюється, є таким, як визначено у будь-якому з пп. 7 або 8.

22. Кон'югат за будь-яким із пп. 19-21, де G^2 являє собою Ac або Moc або являє собою карбаматну захисну групу, вибрану з:

Alloc,
Fmoc,
Boc,
Troc,
Teoc,
Psec,
Cbz,
PNZ.

20

25

23. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22 для застосування в терапії.

24. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22 для застосування для лікування проліферативного захворювання у суб'єкта, де зазначене захворювання являє собою рак.

30 25. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22, де зазначене антитіло являє собою сконструйоване на основі цистеїну антитіло.

26. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22, де зазначене антитіло являє собою антитіло, яке зв'язується з рецептором ErbB.

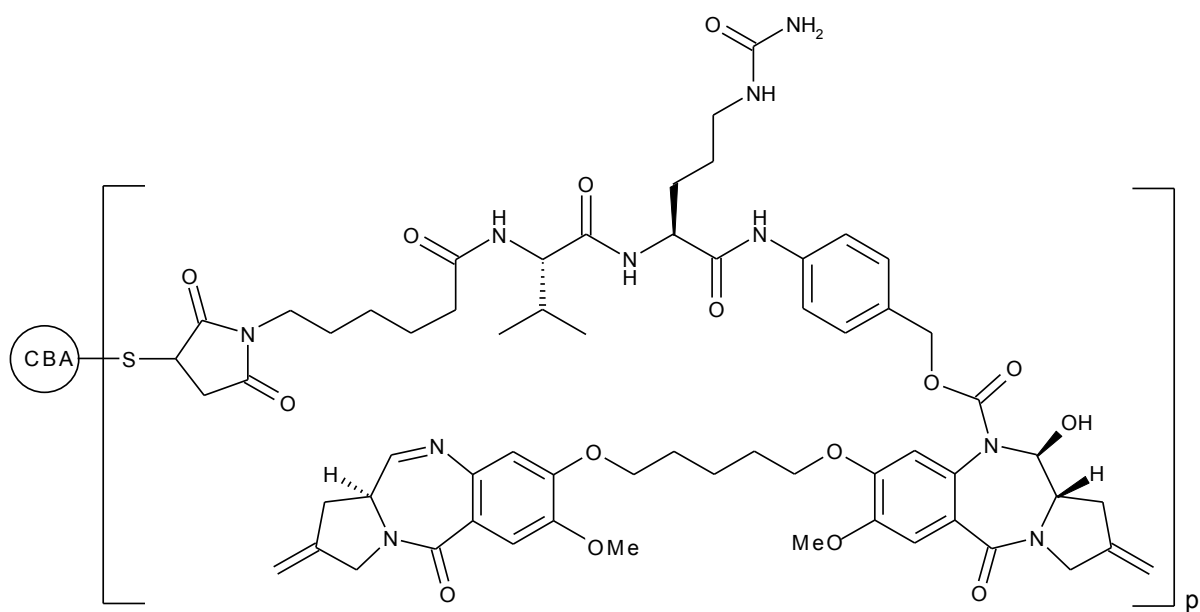
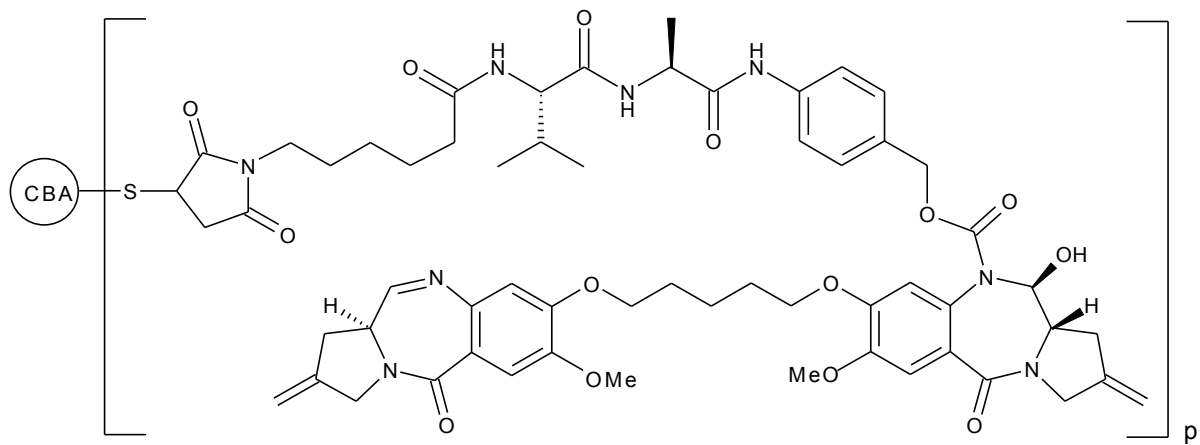
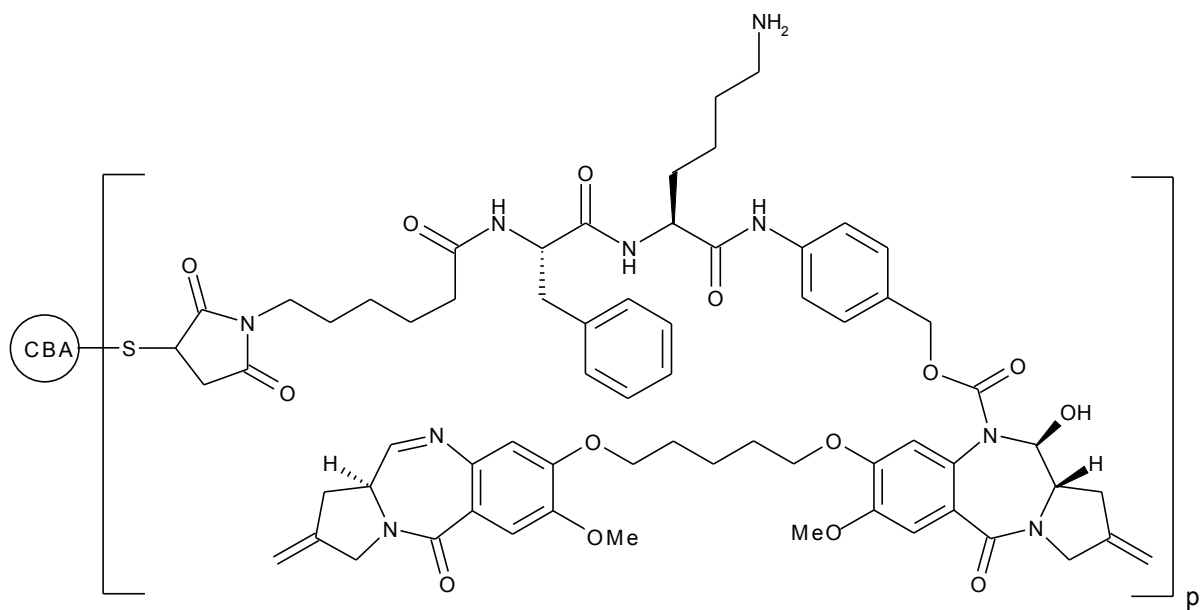
27. Кон'югат за п. 26, де зазначене антитіло являє собою трастузумаб.

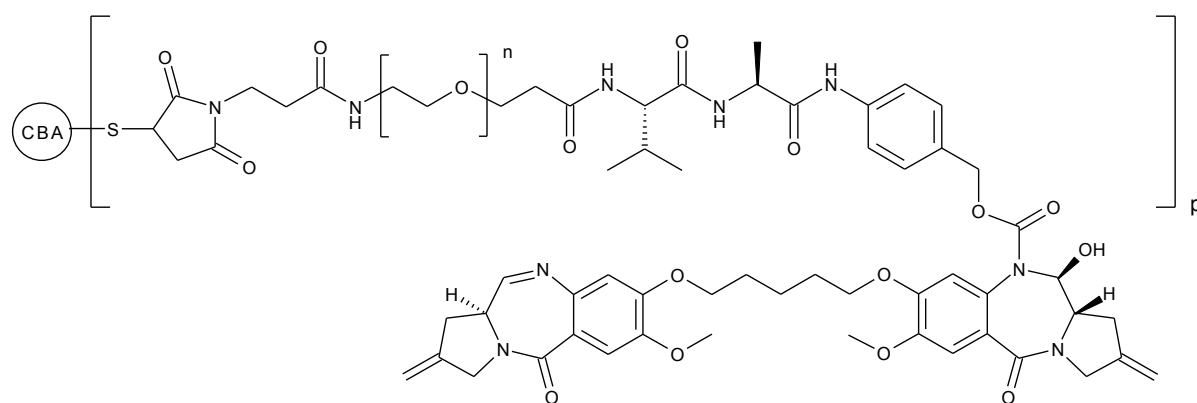
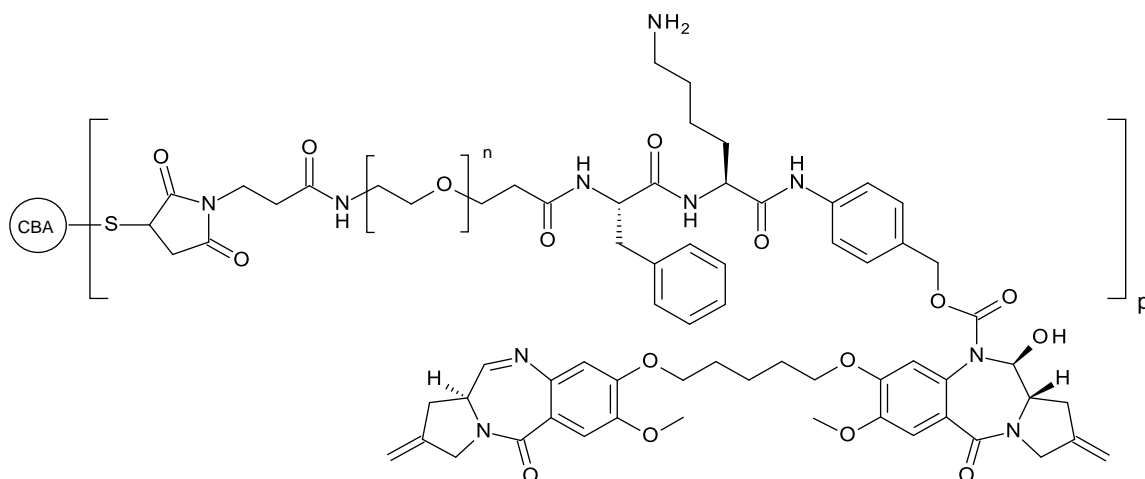
35 28. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22, де зазначене антитіло являє собою антитіло до HER2, до Stear1 або до CD22.

29. Кон'югат за будь-яким із пп. 24-28, де p дорівнює 1, 2, 3 або 4.

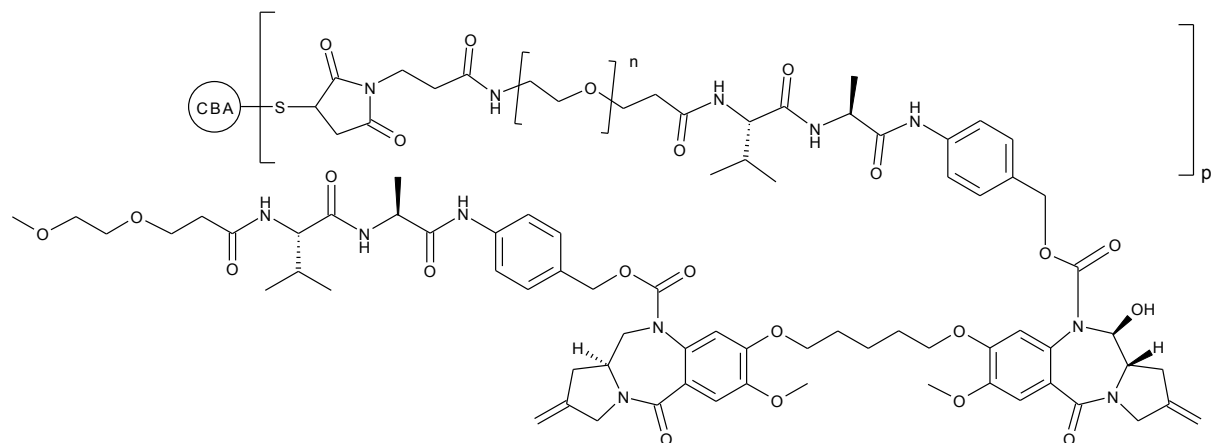
40 30. Суміш кон'югатів антитіло-лікарський засіб, яка включає кон'югат за будь-яким із пп. 1-22 і 25-29, де середнє навантаження лікарського засобу на антитіло у вказаній суміші становить від приблизно 2 до приблизно 5.

31. Кон'югат за будь-яким із пп. 1-22 і 25-29, який має формулу, вибрану з:





5 i



де n дорівнює цілому числу від 1 до 24.

32. Кон'югат за п. 31, де n дорівнює цілому числу від 1 до 12.

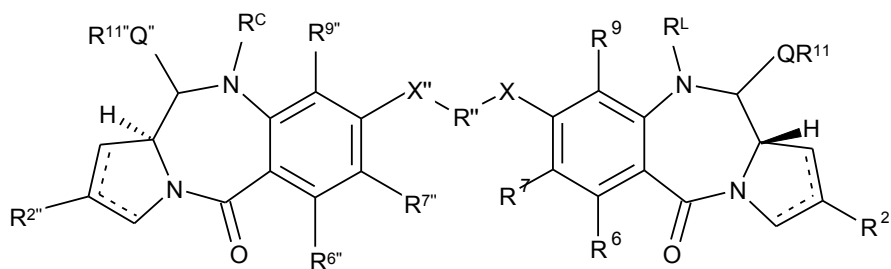
10 33. Кон'югат за п. 32, де n дорівнює 4 або 8.

34. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат за будь-яким із пп. 1-22 або 25-33 і фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або наповнювач.

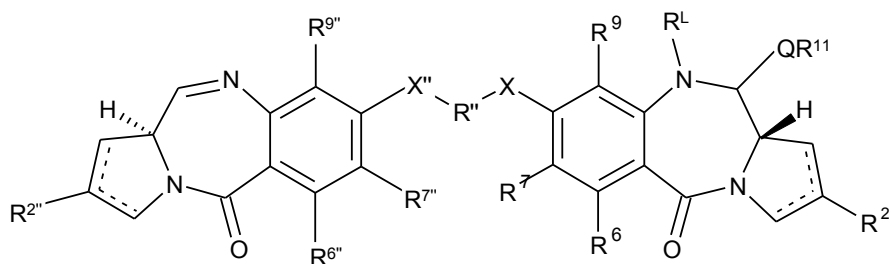
35. Фармацевтична композиція за п. 34, яка додатково містить терапевтично ефективну кількість хіміотерапевтичного агента.

15 36. Застосування кон'югата за будь-яким із пп. 1-22 або 25-33 для отримання лікарського засобу для застосування для лікування проліферативного захворювання у суб'єкта.

37. Сполука формули (EB) або (EC):



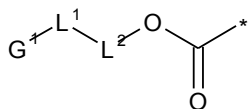
EB



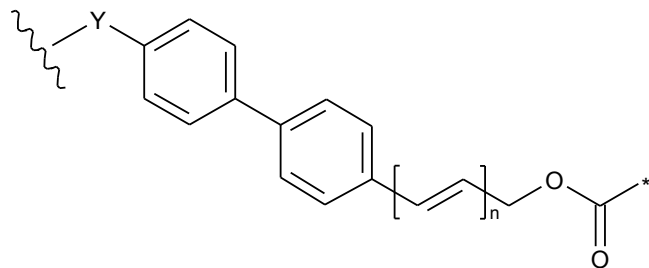
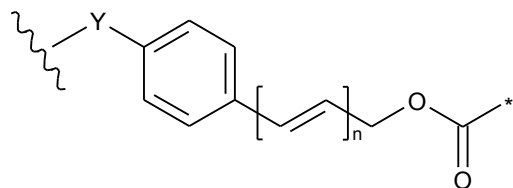
EC

та її солі і сольвати, де

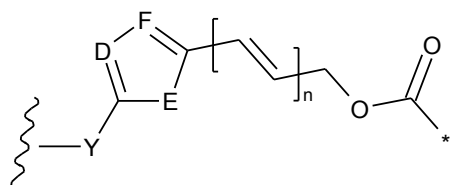
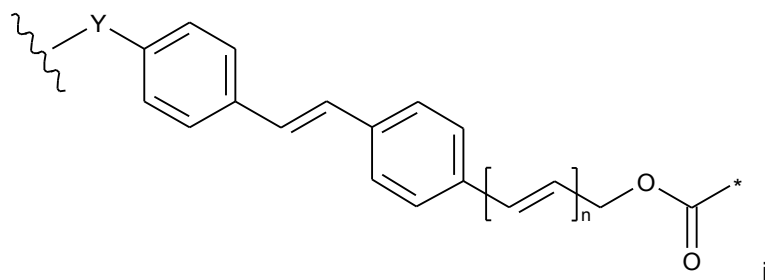
- 5 пунктирні лінії означають необов'язкову наявність подвійного зв'язку між C1 і C2 або C2 і C3;
 R^2 незалежно вибраний з $=CH_2$, OC_{1-6} алкілу або фенілу, необов'язково заміщеного OC_{1-6} алкілом або галогеном;
 R^6 і R^9 являють собою H;
 R^7 являє собою OC_{1-6} алкіл;
 R^L являє собою



де зірочка означає місце приєднання до положення N10, L^1 являє собою дипептид, L^2 являє собою ковалентний зв'язок або разом з $-OC(=O)-$ утворює групу, вибрану з



15



;

де

зірочка означає місце приєднання до положення N10,

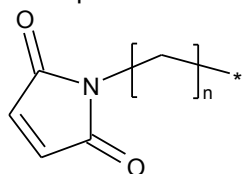
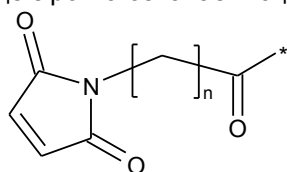
5 хвиляста лінія означає місце приєднання до L¹,
Y являє собою -N(H)-, -O-, -C(=O)N(H)- або -C(=O)O-,

n дорівнює від 0 до 3,

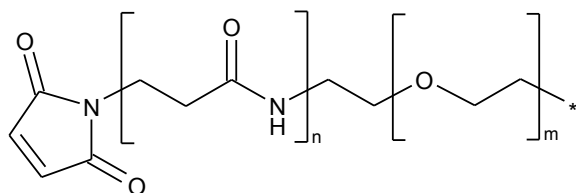
E являє собою O, S або NR,

D являє собою N, CH або CR, i

10 F являє собою N, CH або CR;

G¹ вибраний зде зірочка означає місце приєднання до L¹, i n дорівнює від 0 до 6;

15 де зірочка означає місце приєднання до L¹, i n дорівнює від 0 до 6;

де зірочка означає місце приєднання до L¹, i n дорівнює 0 або 1, m дорівнює від 0 до 30;

Q незалежно вибраний з O, S i NH;

R¹¹ являє собою H;

20 кожний R i R' являє собою C₁₋₁₂алкіл, необов'язково заміщений однією або більше групами,
вибраними із R, OR, SR, NRR', NO₂, галогену, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR, CONRR', C₃₋₂₀

гетероциклілу та C₅₋₂₀арилу;

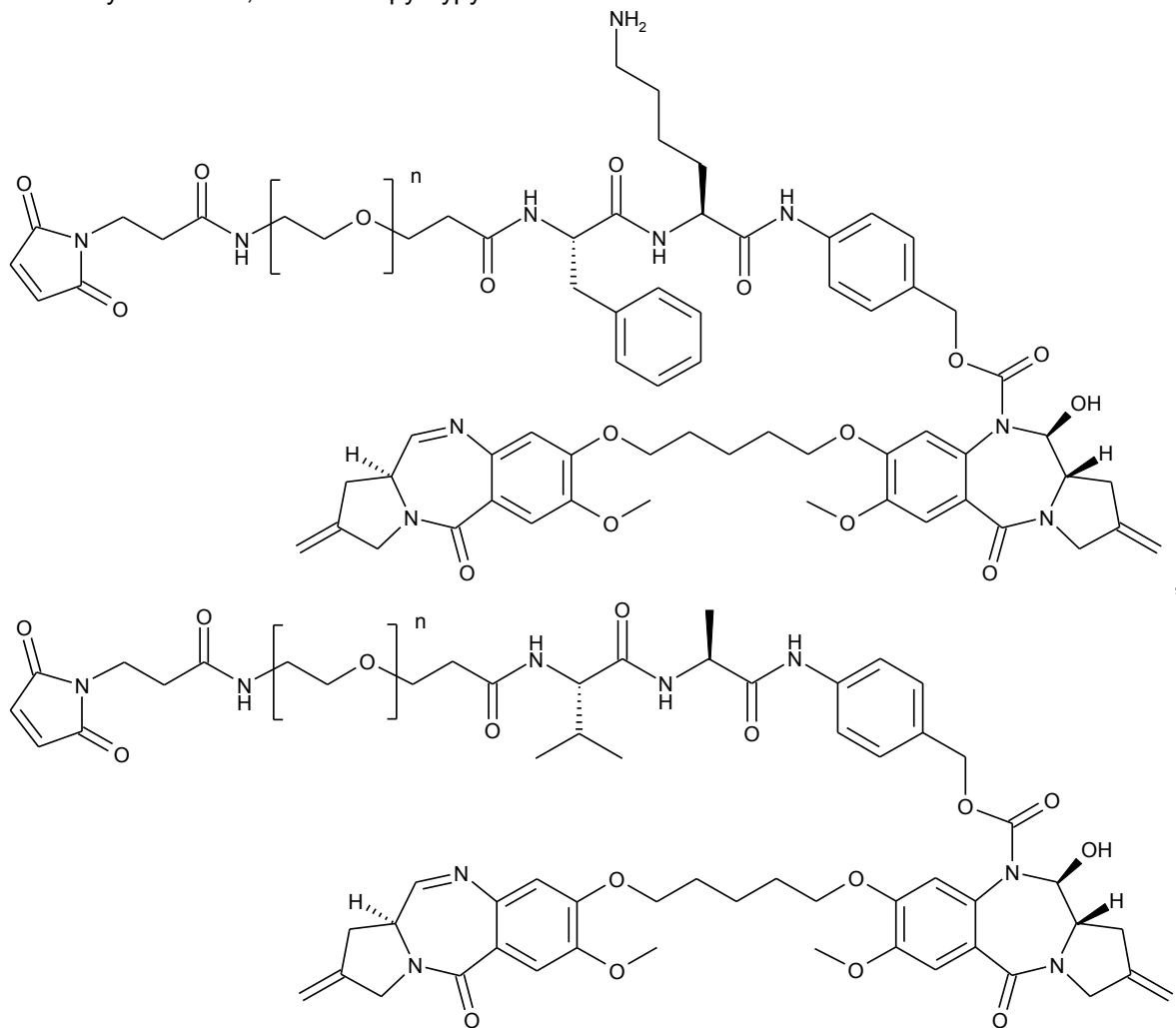
R'' являє собою C₃₋₁₂алкіленову групу, вуглеводневий ланцюг якої може перериватися одним
або більше гетероатомами, наприклад O, S, N(H), NMe, та/або ароматичними кільцями,
25 наприклад бензольним або піридиновим, причому зазначені кільця необов'язково містять як
замісник NH₂;

кожний X являє собою O; i

де R²ⁿ, R⁶ⁿ, R⁷ⁿ, R⁹ⁿ, R¹¹ⁿ, Q'' i X'' є такими, як визначено для R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹, Q i X, відповідно, iR^C являє собою карбаматну захисну групу; i

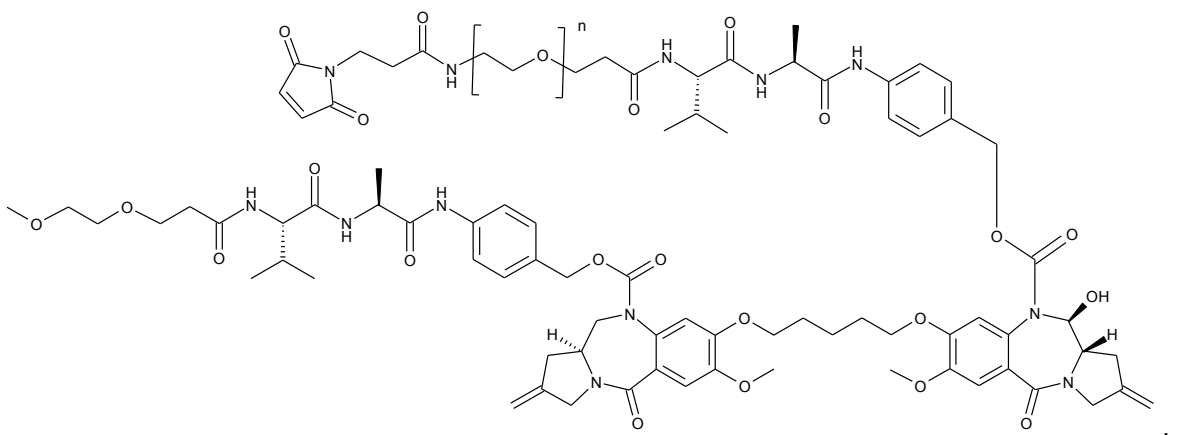
30 R^L відрізняються від групи R^C.

38. Сполука за п. 37, яка має структуру:



або

5



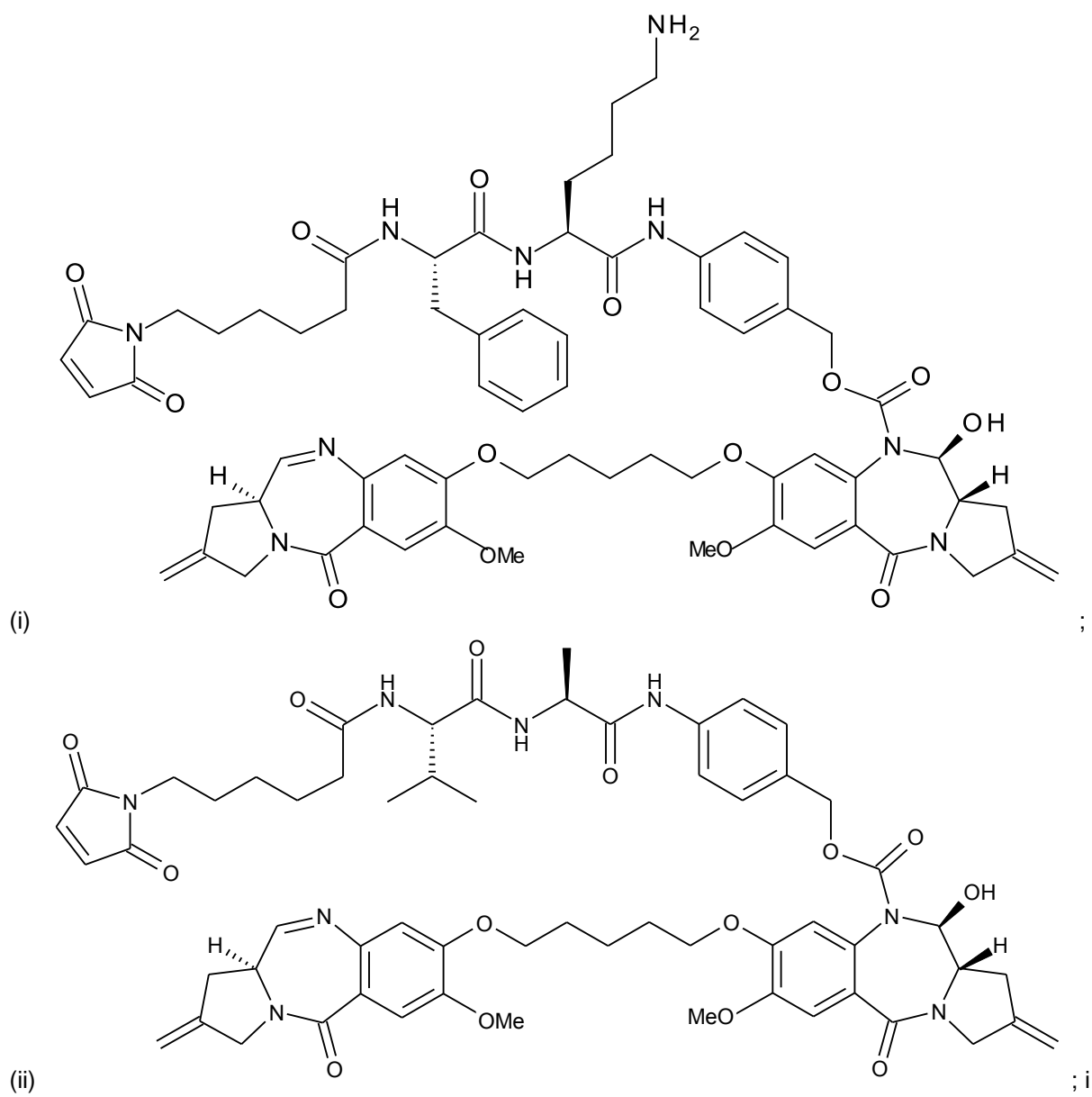
де n дорівнює цілому числу від 1 до 24.

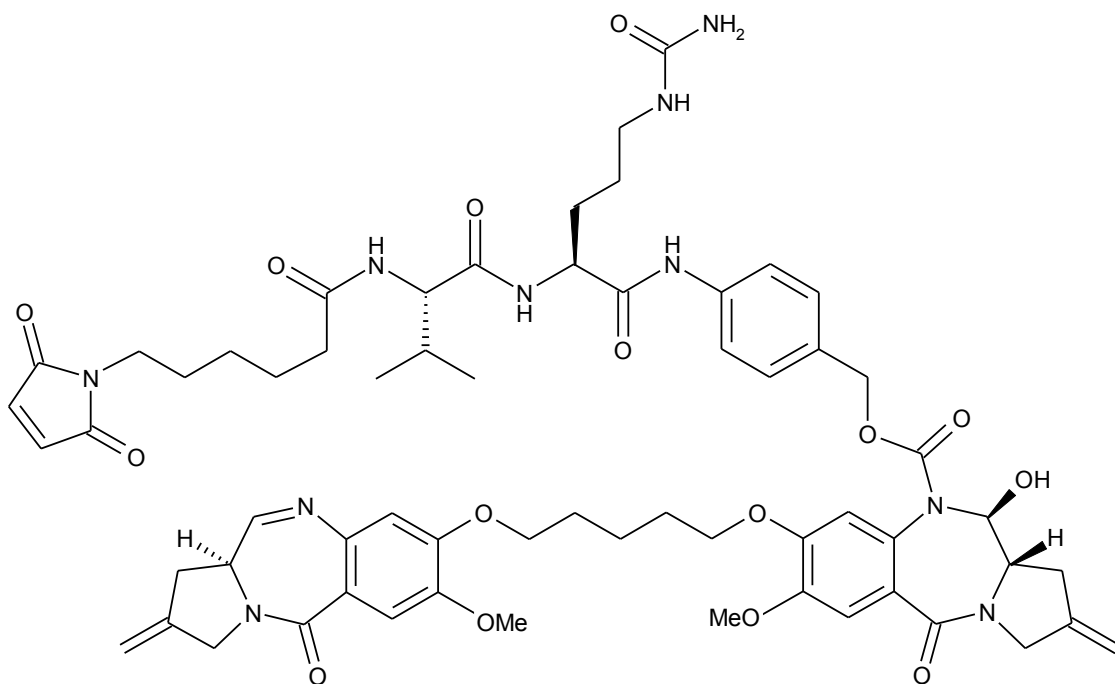
39. Сполука за п. 38, де n дорівнює цілому числу від 1 до 12.

40. Сполука за п. 39, де n дорівнює 4 або 8.

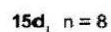
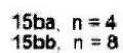
10

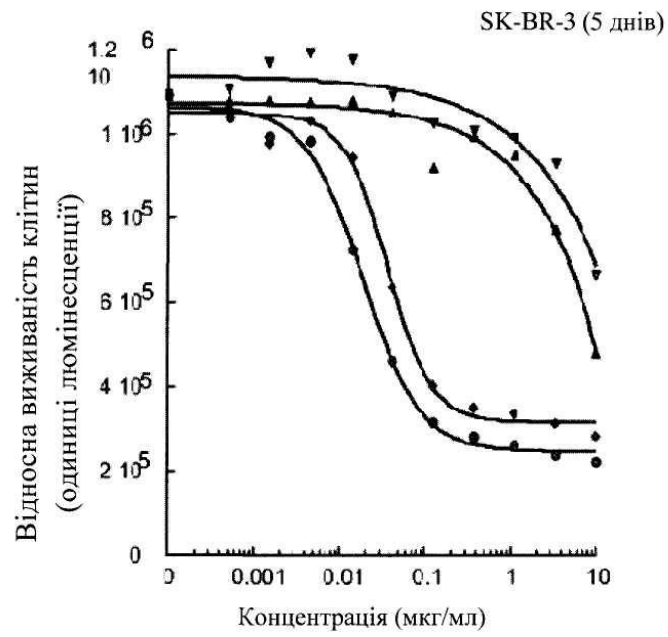
41. Сполука за п. 37, вибрана з:



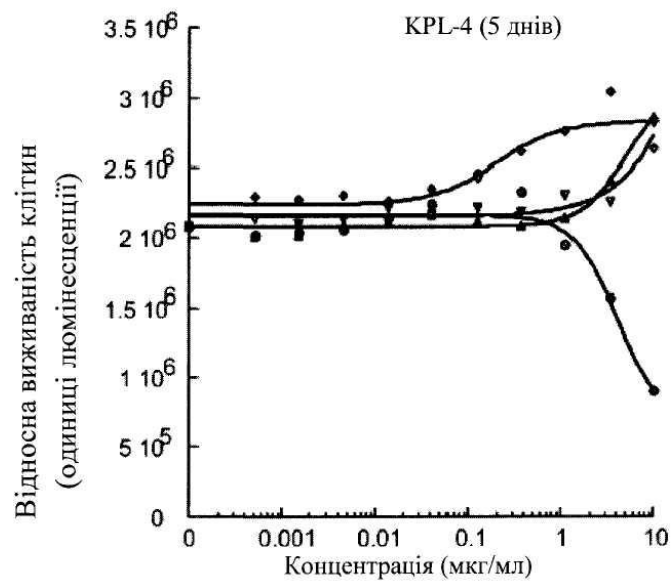


(iii)

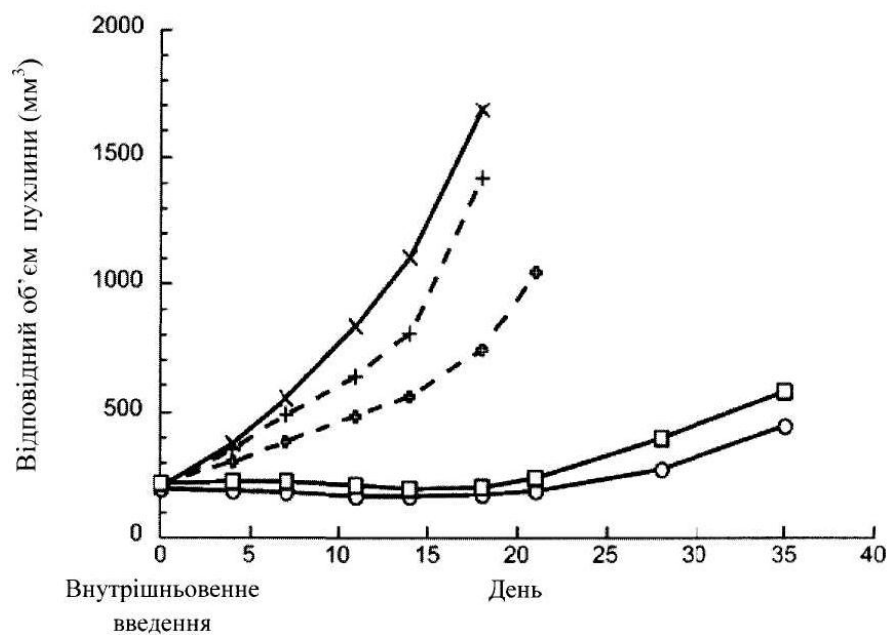
**ΦΙΓΥΡΑ 1a****ФИГУРА 1b**



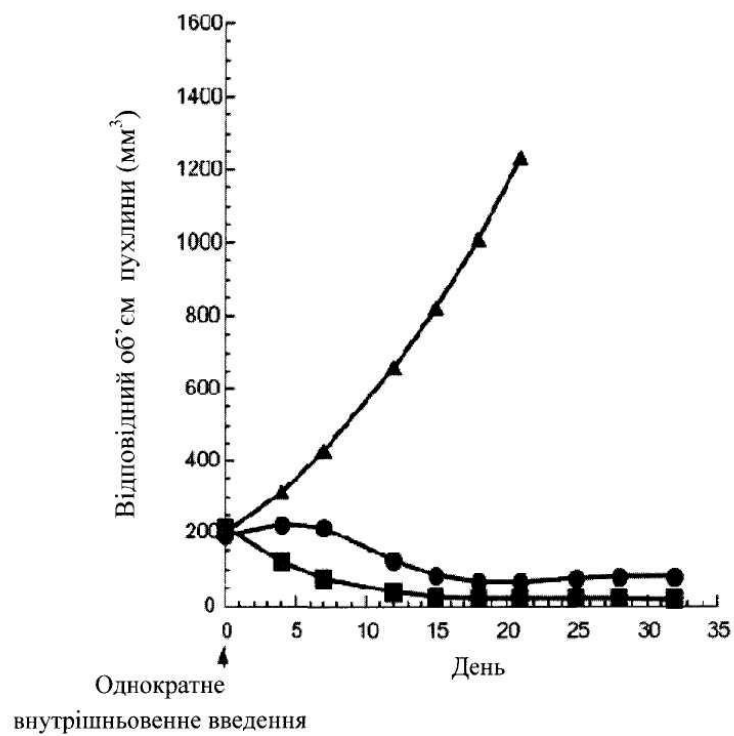
ФІГУРА 2



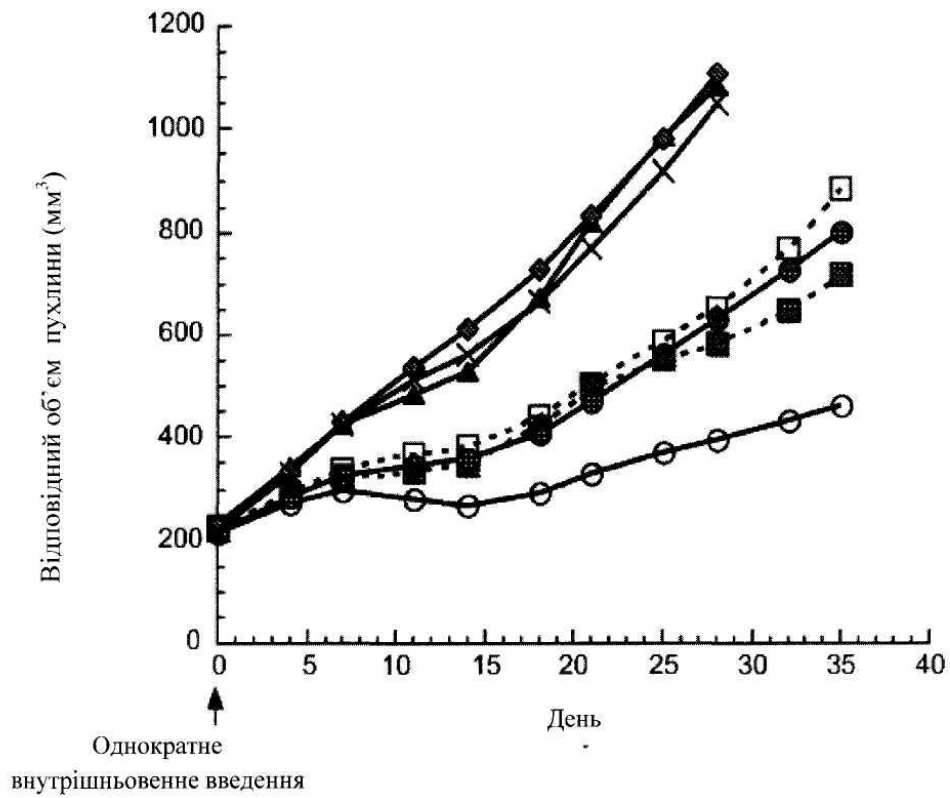
ФІГУРА 3



ФІГУРА 4



ФІГУРА 5



ФІГУРА 6

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