



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85716

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/403

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ХІМІЧНІ ЛІНКЕРИ І ЇХ КОН'ЮГАТИ

1

2

(21) a200613423

(22) 19.05.2005

(24) 25.02.2009

(86) PCT/US2005/017804, 19.05.2005

(31) 60/572,667

(32) 19.05.2004

(33) US

(31) 60/661,174

(32) 09.03.2005

(33) US

(31) 60/669,871

(32) 08.04.2005

(33) US

(46) 25.02.2009, Бюл.№ 4, 2009 р.

(72) БОЙД ШАРОН, ЧЕНЬ ЛЯН, ГАНГВАР САН-ДЖИВ, ГЕРЛАВЕ ВІНСЕН, ХОРГАН КІЛІАН, ЛІ ЧЖИ-ХУН, СУФІ БІЛАЛ

(73) МЕДАРЕКС, ІНК.

(56) SUZAWA T ET AL: "Synthesis of a novel duocamycin derivative DU-257 and its application to immunocconjugate using poly(ethylene glycol)-dipeptidyl linker capable of tumor specific activation" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 8, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 2175-2184, XP002342901 ISSN: 0968-0896

SUZAWA T ET AL: "Synthesis and HPLC analysis of enzymatically cleavable linker consisting of poly(ethylene glycol) and dipeptide for the development of immunoconjugate" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 69, no. 1, 3 October 2000 (2000-10-03), pages 27-41, XP004217532 ISSN: 0168-3659

WO 2004/032828 A 22.04.2004

US 2003/096743 A1 22.05.2003

EP 0 624 377 A 17.11.1994

US 5 739 350 A 14.04.1998

EP 0 563 475 A 06.10.1993

US 6 214 345 B1 10.04.2001

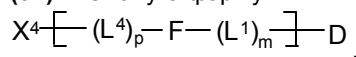
EP 0 867 190 A 30.09.1998

DUBOWCHIK G M ET AL: "Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 83, 1999, pages 67-123, XP002391774 ISSN: 0163-7258

WO 2004/073656 A 02.09.2004

HAY M P ET AL: "A 2-nitroimidazole carbamate prodrug of 5-amino-1-(chloromethyl)-3-[5 ,6,7-trimethoxyindol-2-yl)carbonyl]-1,2-di hydro -3H-benz[e]indole (amino-seco-CBI-TMI) for use with ADEPT and GDEPT" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 15, 2 August 1999 (1999-08-02), pages 2237-2242, XP004174167 ISSN: 0960-894X WO 03/043583 A 30.05.2003

(57) 1. Сполука формули



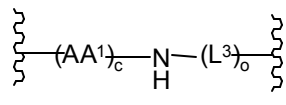
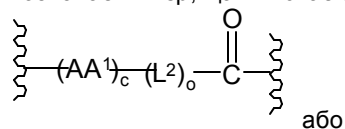
де

D означає лікарську частину, що має підвишену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тіол, карбоксил, альдегід і кетон;

L¹ означає саморуйнівний лінкер;

m дорівнює цілому числу 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

F означає лінкер, що включає структуру:



де

AA¹ означає один або більше компонентів, незалежно вибраних з групи, яка включає природні амінокислоти і штучні α-амінокислоти;

c дорівнює цілому числу від 1 до 20;

L² означає саморуйнівний лінкер;L³ означає спейсерну групу, що включає первинний або вторинний амін або карбоксильну функціональну групу; в якій, якщо присутній L³, m дорівнює 0 і або амін від L³ утворює амідний зв'язок з підвищеною карбоксильною функціональною групою від D, або карбоксил від L³ утворює амідний зв'язок з підвищеною аміною функціональною групою від D;

O дорівнює 0 або 1;

(13) C2

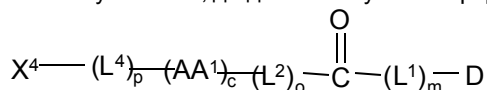
(11) 85716

(19) UA

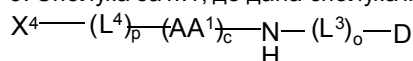
L⁴ означає лінкерний компонент, в якому L⁴ не містить карбоксильної ацильної групи, безпосередньо приєднаної до N-кінця (AA¹)_c; р дорівнює 0 або 1; і

X⁴ означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти.

2. Сполука за п.1, де дана сполука має формулу:



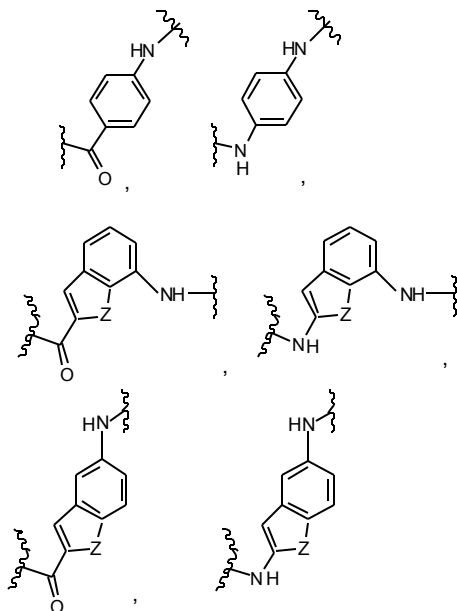
3. Сполука за п.1, де дана сполука має формулу:



4. Сполука за п.3, де L³ містить ароматичну групу.

5. Сполука за п.4, де L містить бензойну кислотну групу, анілінову групу або індольну групу.

6. Сполука за п.4, де -L³-NH- містить групу, що має структуру, вибрану з групи, яка включає:



де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR²³, і де R²³ означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу.

7. Сполука за будь-яким з пп.1-6, де L⁴ містить нециклічний фрагмент.

8. Сполука за будь-яким з пп.1-7, де L⁴ підвищує розчинність сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L⁴.

9. Сполука за будь-яким з пп.1-8, де L⁴ знижує агрегацію сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L⁴.

10. Сполука за будь-яким з пп.1-9, де L⁴ містить поліетиленглікольний фрагмент.

11. Сполука за п.10, де поліетиленглікольний фрагмент містить 3-12 ланок, що повторюються.

12. Сполука за п.11, де поліетиленглікольний фрагмент містить 2-6 ланок, що повторюються.

13. Сполука за п.12, де поліетиленглікольний фрагмент містить 4 ланки, що повторюються.

14. Сполука за будь-яким з пп.1-13, де (AA¹)_c являє собою пептидну послідовність, що розщеплюється протеазою, яка експресується в пухлинній тканині.

15. Сполука за п.14, де протеаза являє собою лізосомальну протеазу.

16. Сполука за будь-яким з пп.1-15, де с дорівнює цілому числу від 2 до 6.

17. Сполука за п.16, де с дорівнює 2, 3 або 4.

18. Сполука за будь-яким з пп.1-17, де амінокислота в (AA¹)_c, розташована ближче усього до лікарського фрагмента, вибрана з групи, яка включає: Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr і Val.

19. Сполука за будь-яким з пп.1-18, де (AA¹)_c являє собою пептидну послідовність, вибрану з групи, яка включає Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нітро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 1), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 2) і Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 3).

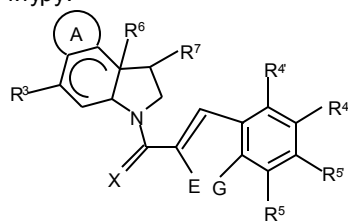
20. Сполука за будь-яким з пп.1-19, де (AA¹)_c являє собою Val-Cit або Val-Lys.

21. Сполука за будь-яким з пп.1-20, де D являє собою цитотоксичні ліки.

22. Сполука за п.21, де D містить хімічно реакційноздатну функціональну групу, вибрану з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфгідрил і карбоксил.

23. Сполука за п.21, де D вибраний з групи, яка включає: дуокарміцини, CC-1065, аналоги дуокарміцинів на основі CBI, аналоги дуокарміцинів на основі MCBI, аналоги дуокарміцинів на основі CCBI, доксорубіцин, кон'югати доксорубіцину, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, доластатини, доластатин-10, комбретастантин, каліхеаміцин, майтанзин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристин E, ауристин EB (AEB), ауристин EFP (AEFP), монометил ауристин E (MMAE), AE-ефір 5-бензоїлвалеріанової кислоти (AEVB), тубулізини, дизоразол, епотилони, паклітаксел, доцетаксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, цемадотин, елеутеробін, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозинарабінозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидеїн, актиноміцин, даунорубіцин, кон'югати даунорубіцину, мітоміцин C, мітоміцин A, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, допофілотоксин, похідні допофілотоксину, етопозид, етопозидфосфат, вінкрістин, таксол, таксотеретиноева кислота, масляна кислота, N⁸-ацетилспермідин і камптотетин.

24. Сполука за будь-яким з пп.1-23, де D має структуру:



де циклічна система А означає компонент, вибраний із заміщеної або незаміщеної арильної, заміщеної або незаміщеної гетероарильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклоалкільної групи; Е і G означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гетероатома, простого зв'язку, або Е і G об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу;

Х означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} ;

R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає $(=\text{O})$, SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де

R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$, SR^{12} і $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$, в яких

R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R^4 , R^5 і R^6 являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$, де

n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

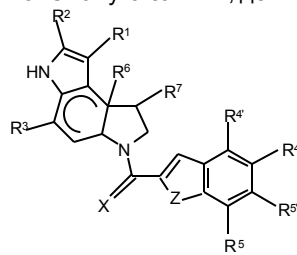
R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і якщо присутній, то R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає CH_2X^1 або $-\text{CH}_2-$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де X^1 означає відхідну групу,

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F.

25. Сполука за п.24, де D має структуру:



де

Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

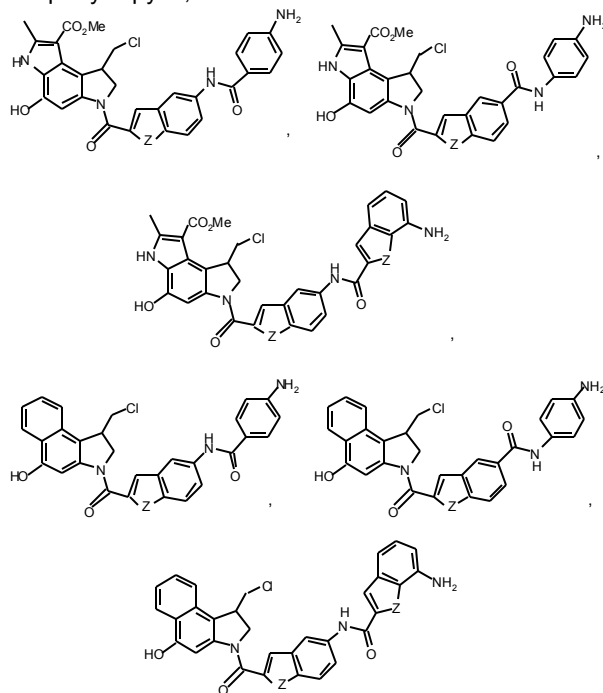
R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, NR^9R^{10} , $\text{NR}^9\text{NHR}^{10}$ і OR^9 , в яких R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; і

R^2 означає Н, заміщений алкіл або незаміщений нижчий алкіл;

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F.

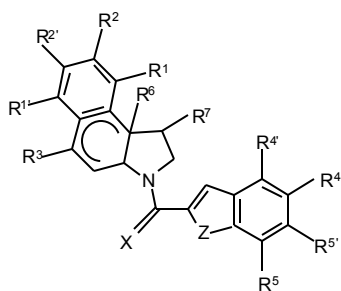
26. Сполука за п.25, де R^2 означає незаміщений нижчий алкіл.

27. Сполука за п.3, де $\text{NH}_2-(\text{L}^3)\text{-D}$ має структуру, вибрану з групи, яка включає:



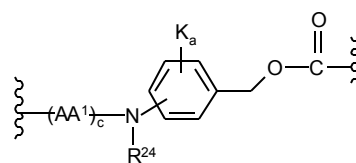
і де Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; і де NH_2 група на кожній структурі взаємодіє з $(\text{AA}^1)_c$, утворюючи $-(\text{AA}^1)_c\text{NH}-$.

28. Сполука за п.24, де D має структуру:



де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR^{23} , де R^{23} являє собою компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$, де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси; і R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F.

29. Сполука за п.2, де F має структуру:

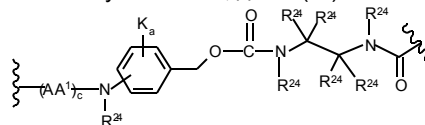


де R^{24} вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

кожний K являє собою компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, $\text{NR}^{21}\text{COR}^{22}$, $\text{OCONR}^{21}\text{R}^{22}$, OCOR^{21} і OR^{21} ,

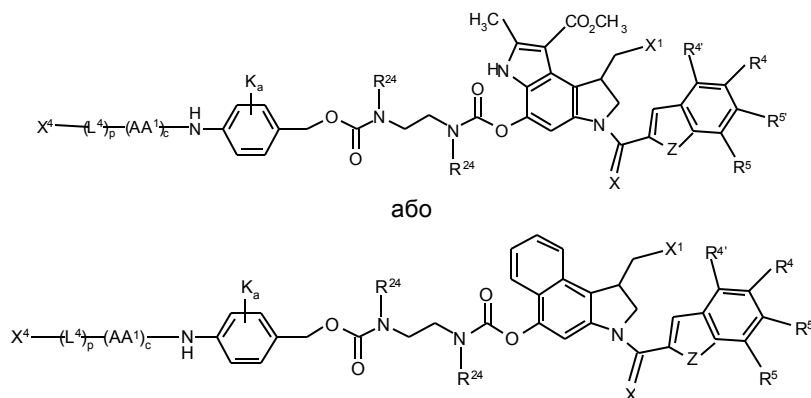
де R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл; і а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4.

30. Сполука за п.29, де $-\text{F}(\text{L}^1)_m$ має структуру:



де кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл.

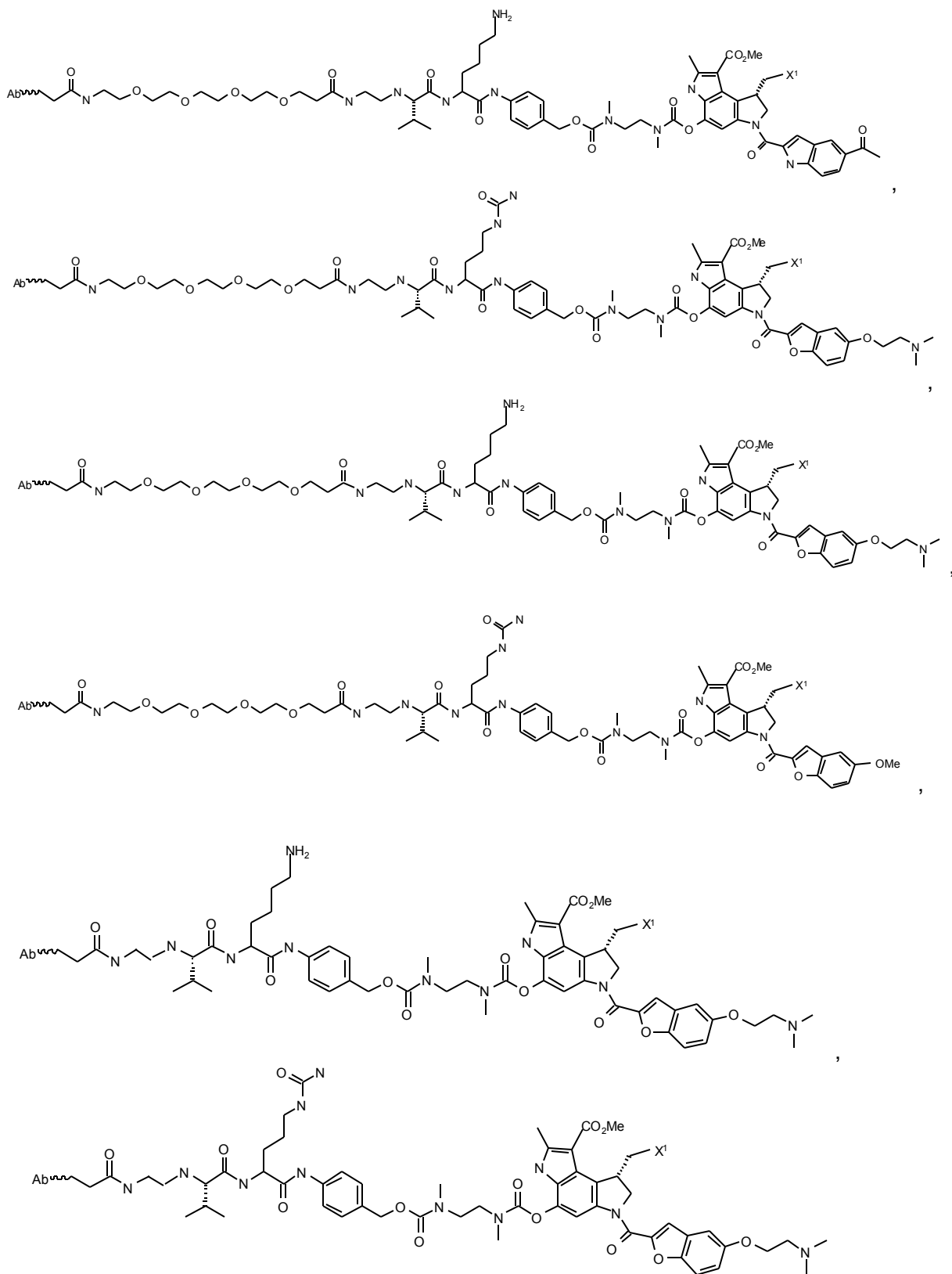
31. Сполука за п.29, що має структуру:

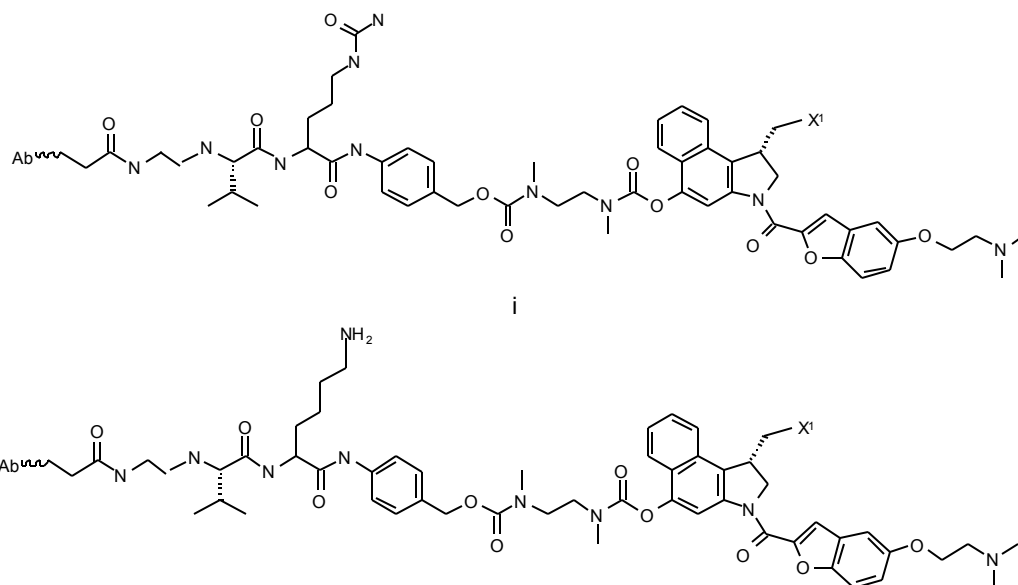


де X^1 означає галоген; H означає компонент, вибраний з O, S і NR^{23} , R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; і R^4 , R^4 , R^5 і R^5 являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 ,

$\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, OR^{15} і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20; і R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну

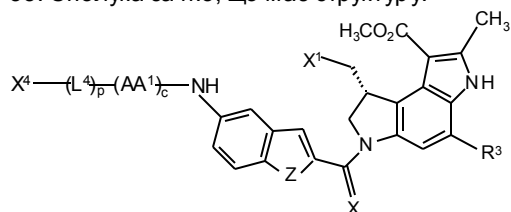
32. Сполука за п.29, яка вибрана з групи, яка включає:



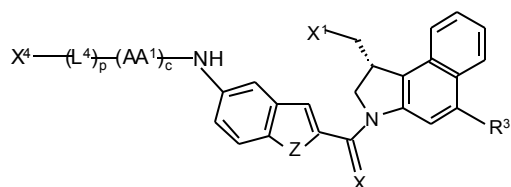


де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

33. Сполука за п.3, що має структуру:



або



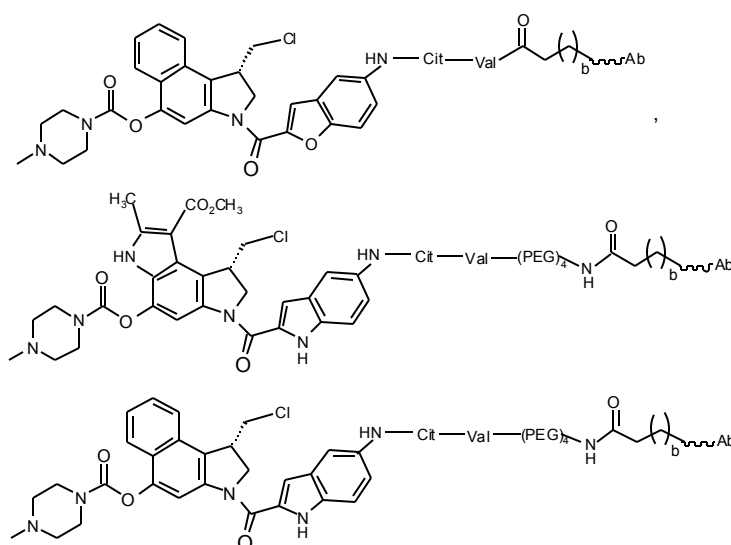
де X^1 означає відхідну групу;
Z і X являють собою компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу,

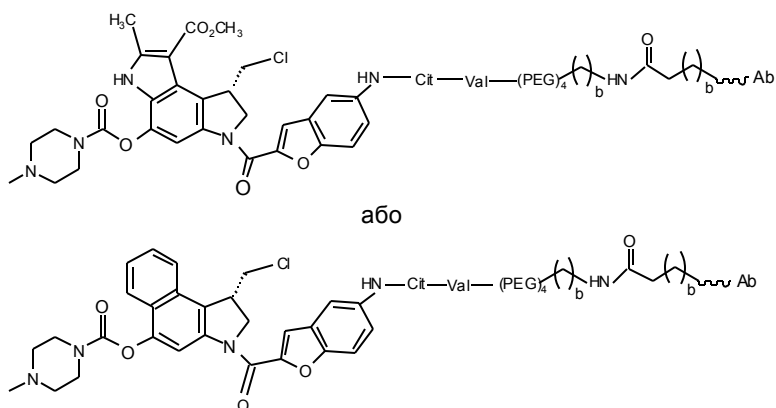
заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; і

R^3 вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, OR^{15} і $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів.

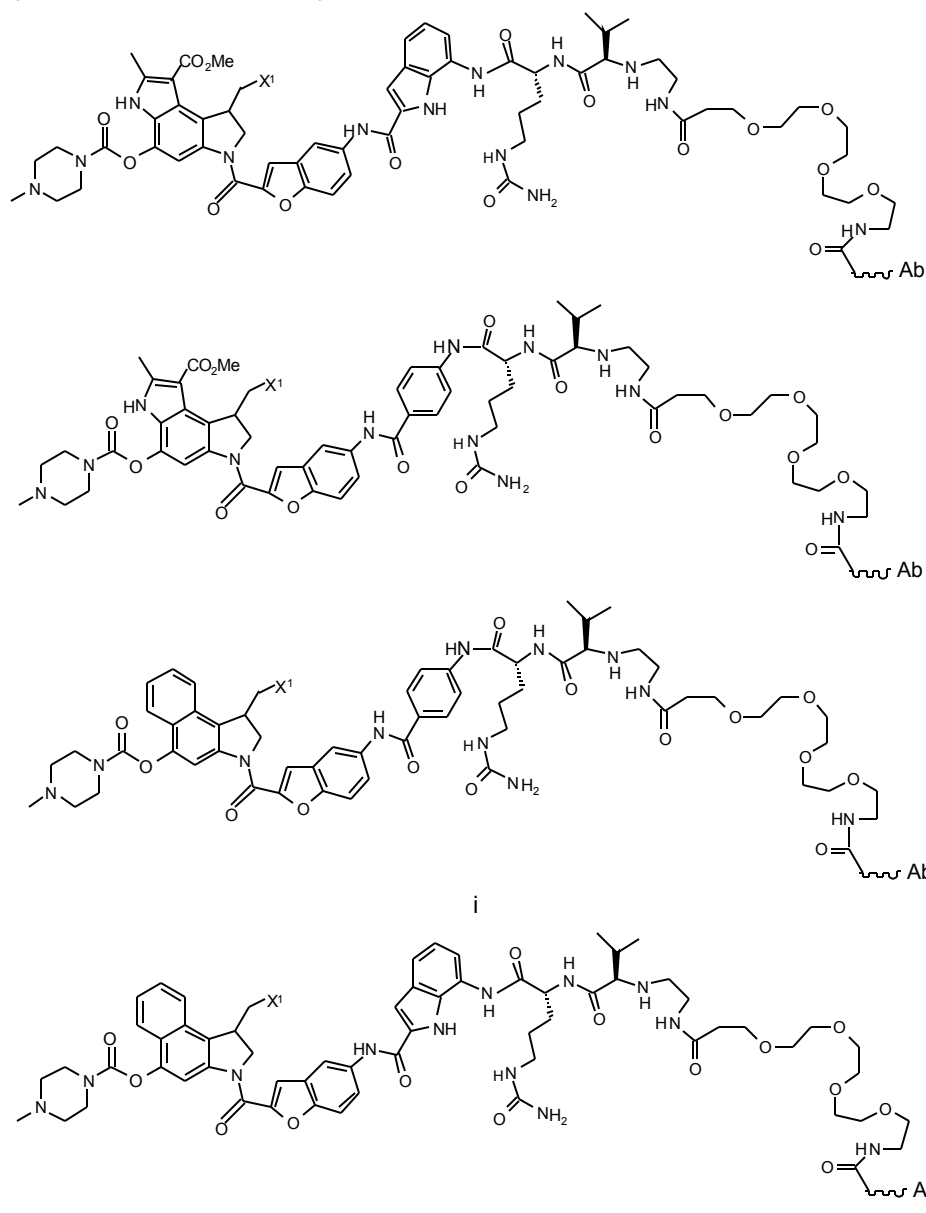
34. Сполука за п.33, що має структуру:





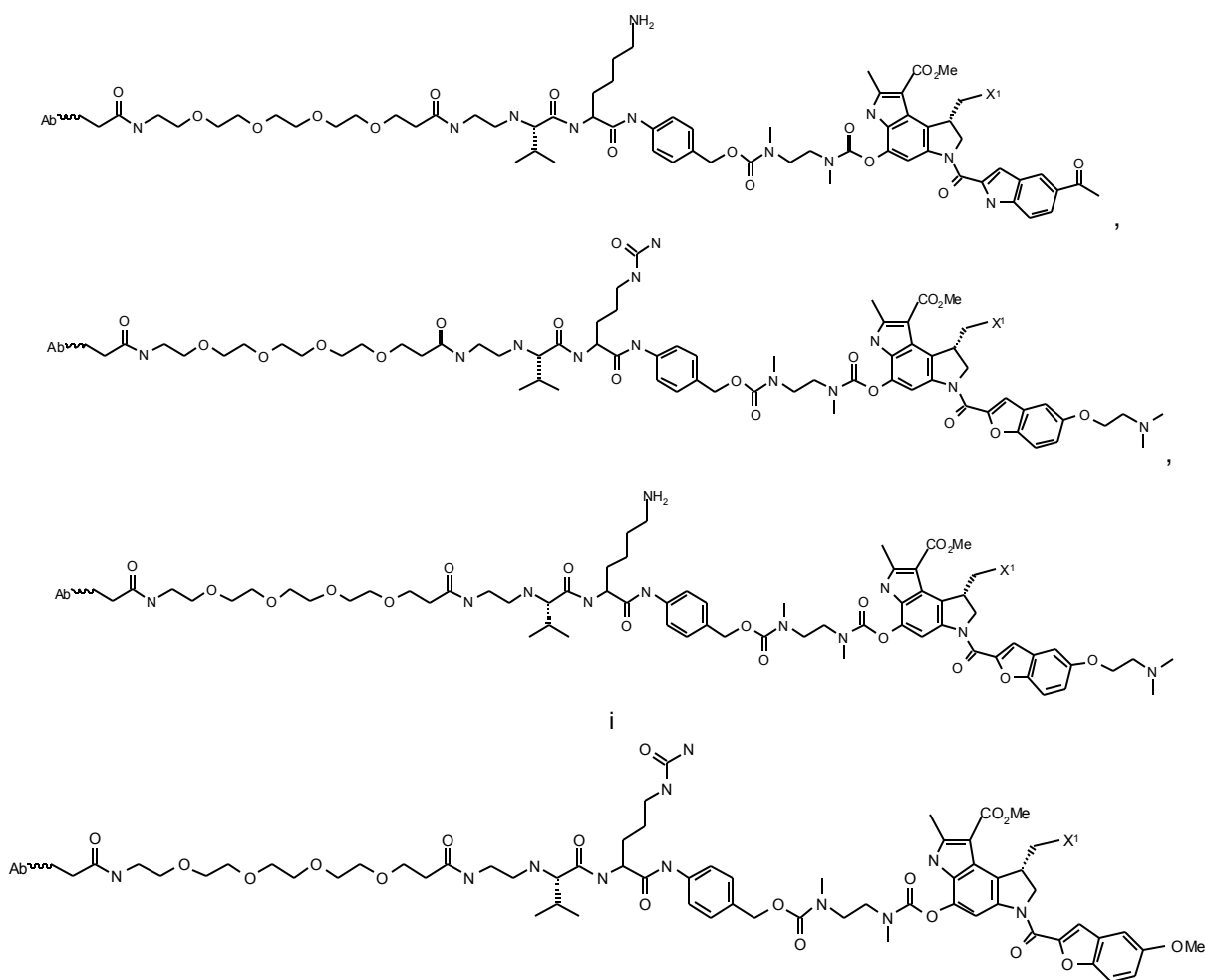
де кожний b незалежно дорівнює цілому числу від 0 до 20, і де Ab означає антитіло або його фрагмент.

35. Сполука за п.3, яка вибрана з групи, яка включає:



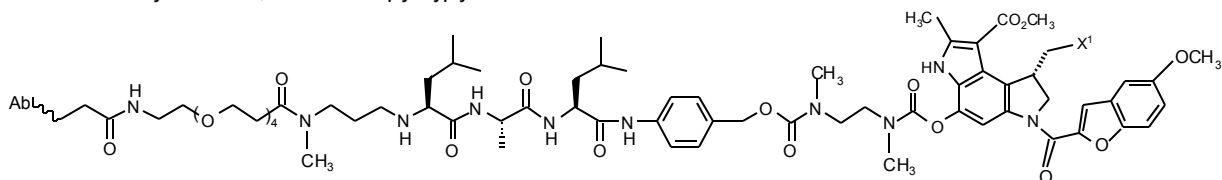
де X^1 означає Cl або Br , і Ab означає антитіло або його фрагмент.

36. Сполука за п.3, вибрана з групи, яка включає:



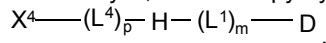
де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

37. Сполука за п.3, яка має структуру:



де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

38. Сполука, яка має структуру



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L означає саморуйнівний лінкер;

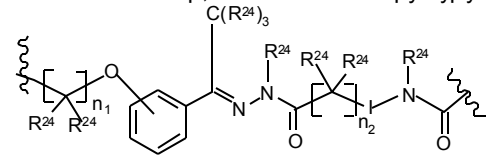
m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L^4 означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1;

H означає лінкер, який включає структуру:



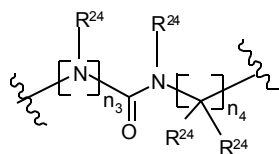
де

n_1 дорівнює цілому числу від 1 до 10;

n_2 дорівнює 0, 1 або 2;

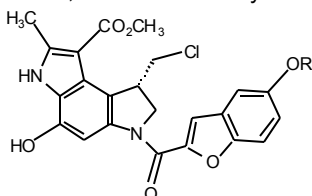
кожний R^{24} являє собою компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл; і

I означає або зв'язок, або:

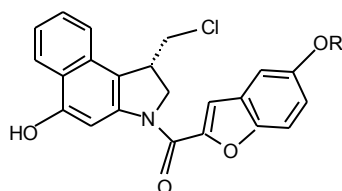


де n_3 дорівнює 0 або 1 за умови, що, якщо n_3 дорівнює 0, то n_2 не дорівнює 0; і n_4 дорівнює 1, 2 або 3,

де, якщо I означає зв'язок, n_1 дорівнює 3 і n_2 дорівнює 1, то D не може бути:



або



де R означає Me або $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$.

39. Сполука за п.38, де заміщення по фенільному циклу являє собою пара-заміщення.

40. Сполука за будь-яким з пп.38 і 39, де n_1 дорівнює 2, 3 або 4.

41. Сполука за п.40, де n_1 дорівнює 3.

42. Сполука за будь-яким з пп.38-41, де n_2 дорівнює 1.

43. Сполука за п.42, де I означає зв'язок.

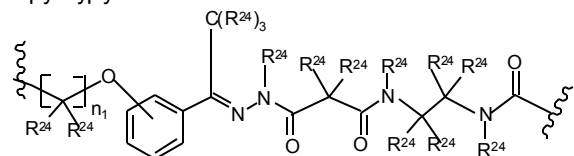
44. Сполука за будь-яким з пп.38-43, де H утворює 6-членний саморуйнівний лінкер при відщепленні.

45. Сполука за п.42, де n_3 дорівнює 0 і n_4 дорівнює 2.

46. Сполука за будь-яким з пп.38-43, де H утворює два 5-членних саморуйнівних лінкери при відщепленні.

47. Сполука за будь-яким з пп.38-43, де H утворює 5-членний саморуйнівний лінкер, H утворює 7-членний саморуйнівний лінкер, або H утворює 5-членний саморуйнівний лінкер і 6-членний саморуйнівний лінкер при відщепленні.

48. Сполука за будь-яким з пп.38-43, де H містить структуру:



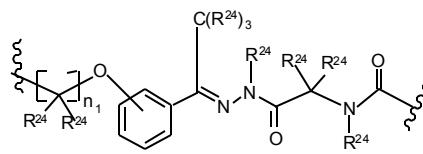
49. Сполука за п.48, де n_1 , дорівнює 2, 3 або 4.

50. Сполука за п.48, де n_1 дорівнює 3.

51. Сполука за будь-яким з пп.48-50, де кожний R^{24} незалежно вибраний з CH_3 і H.

52. Сполука за будь-яким з пп.48-51, де кожний R^{24} означає H.

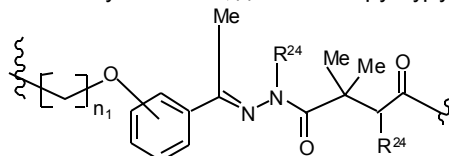
53. Сполука за будь-яким з пп.38-43, де H має структуру:



54. Сполука за п.53, де n_1 дорівнює 3.

55. Сполука за п.53, де кожний R^{24} незалежно вибраний з CH_3 і H.

56. Сполука за п.53, де H має структуру:



57. Сполука за п.53, де H містить гемінальне диметильне заміщення.

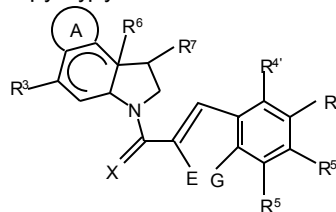
58. Сполука за п.56, де кожний R^{24} незалежно означає H або заміщений або незаміщений алкіл.

59. Сполука за будь-яким з пп.38-58, де D означає цитотоксичні ліки.

60. Сполука за будь-яким з пп.38-59, де D має хімічно реакційноздатну функціональну групу, вибрану з груп, що включають первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфідрил і карбоксил.

61. Сполука за будь-яким з пп.38-60, де D вибраний з групи, яка включає: дуокарміцини, CC-1065, аналоги дуокарміцинів на основі CBI, аналоги дуокарміцинів на основі MCBI, аналоги дуокарміцинів на основі CCBI, доксорубіцин, кон'югати доксорубіцину, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, доластатини, долестатин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристин E, ауристин EB (AEB), ауристин EFP (AEFP), монометилауристин E (MMAE), AE-ефір 5-бензоїлвалеріанової кислоти (AEVB), тубулізини, дизоразол, епотилоли, паклітаксел, доцетаксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, цемадотин, елеутеробін, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозинарабіозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидеїн, актиноміцин, даунорубіцин, кон'югати даунорубіцину, мітоміцин C, мітоміцин A, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, допофілотоксин, похідні допофілотоксину, етопозид, етопозидфосфат, вінкрисдин, таксол, таксотерретиноева кислота, масляна кислота, N-ацетил спермідин і камптотексин.

62. Сполука за будь-яким з пп.38-61, де D має структуру:



де циклічна система A означає компонент, вибраний із заміщеної або незаміщеної арильної, заміщеної або незаміщеної гетероарильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклоалкільної групи;

Е і G означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гетероатома, простого зв'язку, або Е і G об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу;

Х означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} ;

R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає (=O), SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де

R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$, SR^{12} і $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$, в яких

R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільную циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R^4 , R^5 і R^5 являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

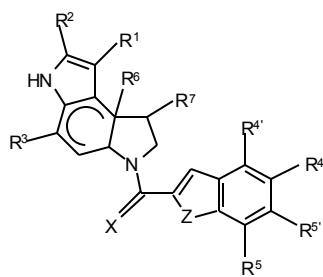
R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільную циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, то R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $\text{-CH}_2\text{-}$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де X^1 означає відхідну групу,

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Н.

63. Сполука за п.62, де D має структуру:



де

Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

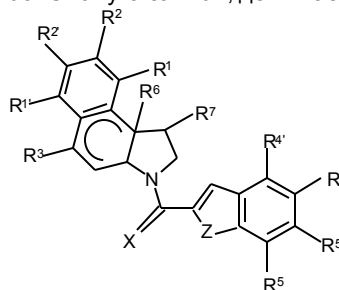
R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, NR^9R^{10} , $\text{NR}^9\text{NHR}^{10}$ і OR^9 , в яких R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; і

R^2 означає Н, заміщений алкіл або незаміщений нижчий алкіл;

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Н.

64. Сполука за п.63, де R^2 означає незаміщений нижчий алкіл.

65. Сполука за п.62, де D має структуру:



де Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких

R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$, де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких

R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає Н або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси; і

R^2 означає Н, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Н.

66. Сполука за будь-яким з пп.38-65, де L^4 містить нециклічний фрагмент.

67. Сполука за будь-яким з пп.38-66, де L^4 підвищує розчинність сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 .

68. Сполука за будь-яким з пп.38-67, де L^4 знижує агрегацію сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 .

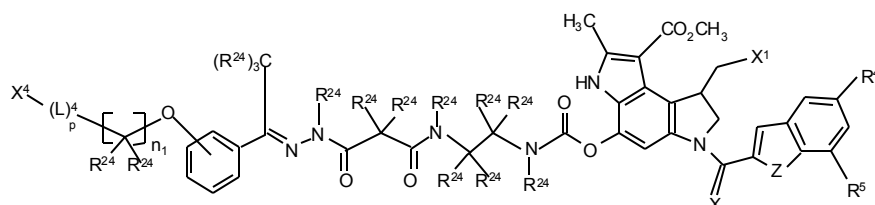
69. Сполука за будь-яким з пп.38-68, де L^4 містить поліетиленглікольний фрагмент.

70. Сполука за п.69, де поліетиленглікольний фрагмент містить 3-12 ланок, що повторюються.

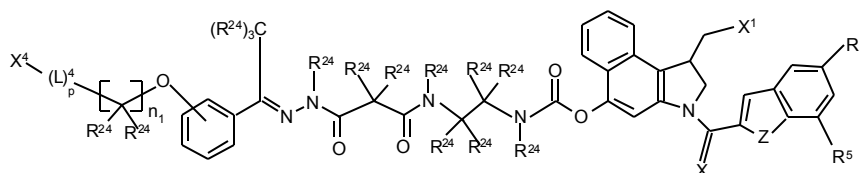
71. Сполука за п.70, де поліетиленглікольний фрагмент містить 2-6 ланок, що повторюються.

72. Сполука за п.71, де поліетиленглікольний фрагмент містить 4 ланки, що повторюються.

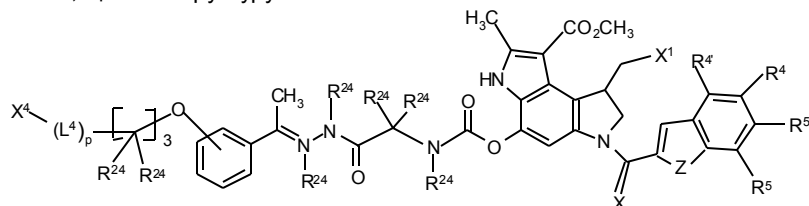
73. Сполука за п.63, що має структуру:



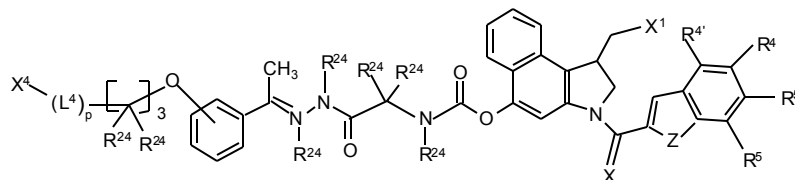
або



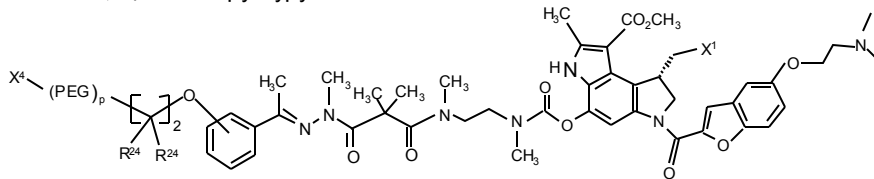
74. Сполука за п.63, що має структуру:



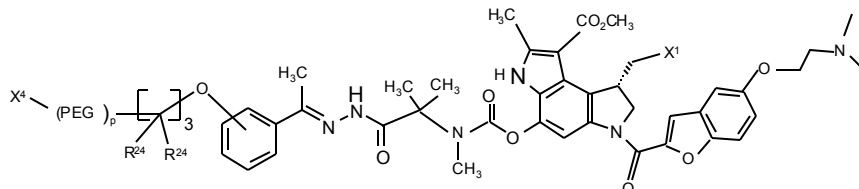
або



75. Сполука за п.63, що має структуру:

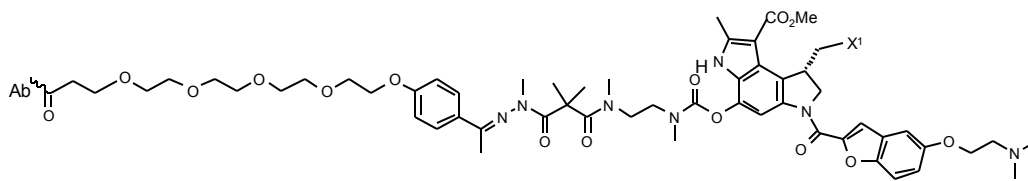


або



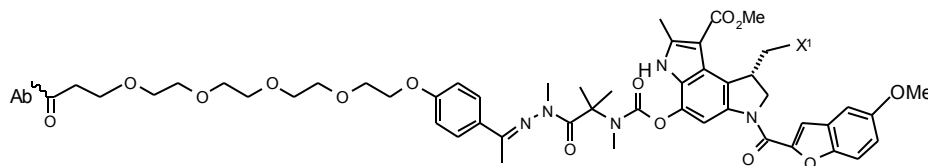
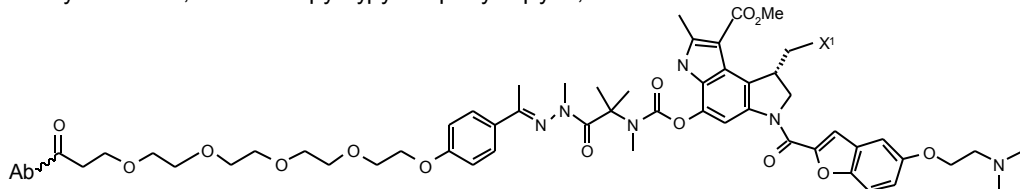
де PEG являє собою поліетиленглікольний фрагмент, і X^1 означає Cl або Br.

76. Сполука за п.63, що має структуру:

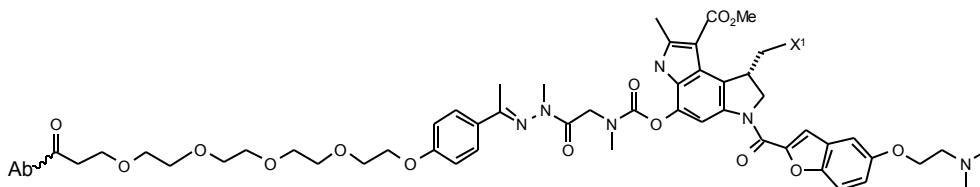


де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

77. Сполука за п.63, яка має структуру вибрану з групи, яка включає:

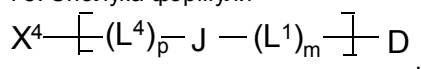


i



де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

78. Сполука формули



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L^1 означає саморуйнівний лінкер;

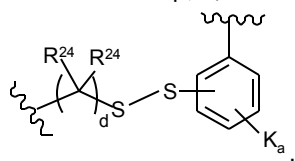
m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

X^4 являє собою компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L^4 означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1;

J означає лінкер, що включає структуру:



де

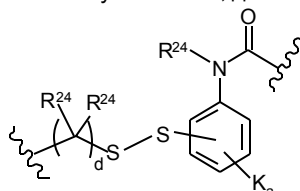
кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, не-

заміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

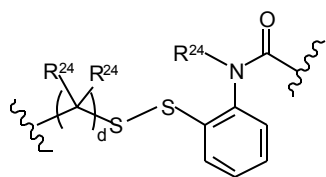
кожний K означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCOR^{21}$ і OR^{21} , де

R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл і незаміщений гетероциклоалкіл; а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 і 4; і d дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3, 4, 5 і 6.

79. Сполука за п.78, де J має структуру:

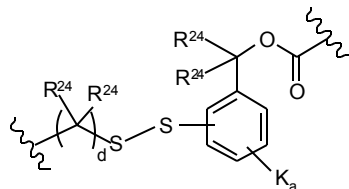


80. Сполука за п.78, де J має структуру:

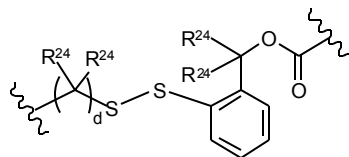


81. Сполука за п.80, де d дорівнює 1 або 2.

82. Сполука за п.78, де J має структуру:



83. Сполука за п.82, де J має структуру:

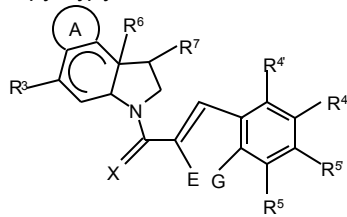


84. Сполука за будь-яким з пп.78-83, де D являє собою цитотоксичні ліки.

85. Сполука за будь-яким з пп.78-84, де D має хімічно реакційноздатну функціональну групу, вибрану з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфгідрил і карбоксил.

86. Сполука за будь-яким з пп.78-85, де D вибраний з групи, яка включає: дуокарміцини, CC-1065, аналоги дуокарміцинів на основі CBI, аналоги дуокарміцинів на основі MCSBI, аналоги дуокарміцинів на основі CCSBI, доксорубіцин, кон'югати доксорубіцину, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, доластатини, доластатин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристин Е, ауристин ЕВ (АЕВ), ауристин ЕФР (АЕФР), монометилауристин Е (ММАЕ), АЕ-ефір 5-бензоїлвалеріанової кислоти (АЕВВ), тубулізини, дизоразол, епотилоли, паклітаксел, доцетаксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, цемадотин, елеутеробін, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозинарабінозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидеїн, актиноміцин, даунорубіцин, кон'югати даунорубіцину, мітоміцин С, мітоміцин А, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, допофілотоксин, похідні допофілотоксину, етопозид, етопозид фосфат, вінкрисдин, таксол, таксотерретиноева кислота, масляна кислота, N⁶-ацетилспермідин і камптотецин.

87. Сполука за будь-яким з пп.78-86, де D має структуру:



де циклічна система А означає компонент, вибраний із заміщеної або незаміщеної арильної, заміщеної або незаміщеної гетероарильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклоалкільної групи;

Е і G являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гетероатома, простого зв'язку, або Е і G об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарили і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу;

Х означає компонент, вибраний з О, S і NR²³;

R²³ означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R³ означає компонент, вибраний з групи, яка включає (=O), SR¹¹, NHR¹¹ і OR¹¹, де

R¹¹ означає компонент, вибраний з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, C(O)R¹²R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²R¹³, SR¹² і SiR¹²R¹³R¹⁴,

в яких

R¹², R¹³ і R¹⁴ являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R¹² і R¹³ разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R⁴, R⁴, R⁵ і R⁵ являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶ і O(CH₂)_n(CH₃)₂, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R¹⁵ і R¹⁶ незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарили, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидили, де R¹⁵ і R¹⁶ разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

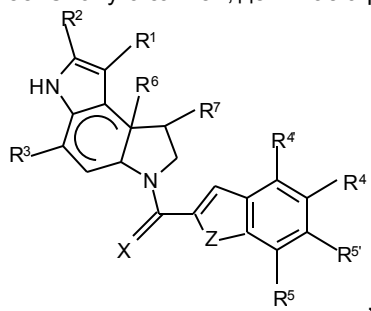
R⁶ означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, то R⁶ і R⁷ об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R⁷ означає CH₂-X¹ або -CH₂, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R⁶, де

X¹ означає відхідну групу,

де щонайменше один з R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁵ або R¹⁶ зв'язує вказаний лікарський засіб з L¹, якщо присутній, або з J.

88. Сполука за п.87, де D має структуру:



де

Z означає компонент, вибраний з O, S і NR²³, де R²³ означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

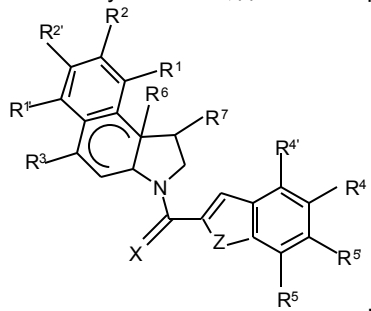
R¹ означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, C(O)R⁸ або CO₂R⁸, де R⁸ являє собою компонент, вибраний із заміщеного алкілу, незаміщеного алкілу, NR⁹R¹⁰, NR⁹NHR¹⁰ і OR⁹, в яких

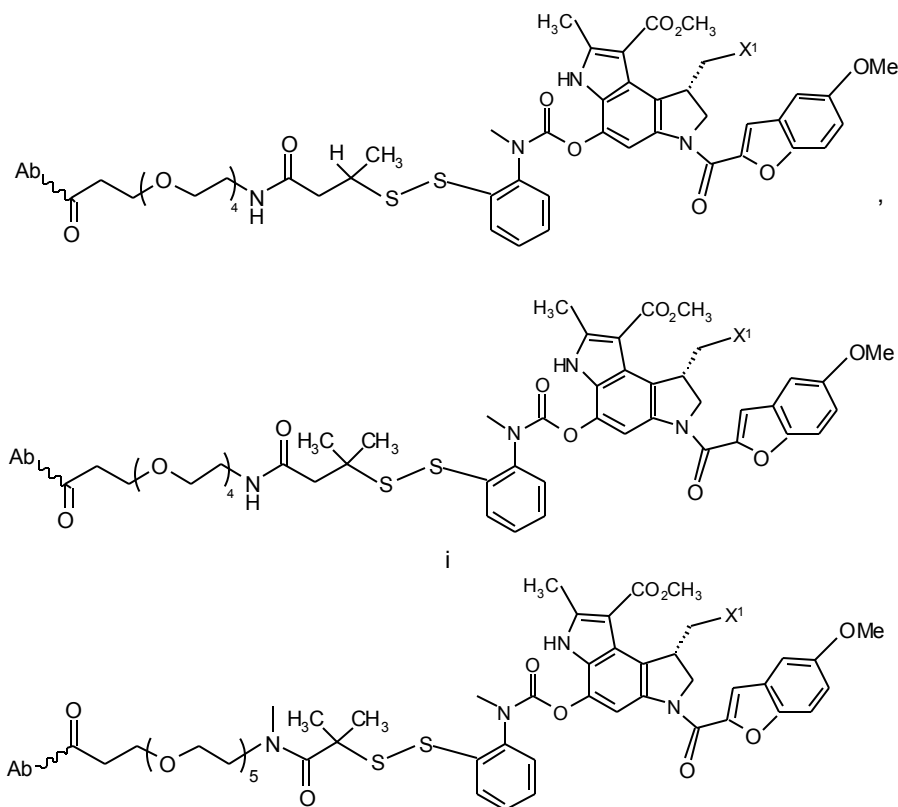
R⁹ і R¹⁰ являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; R² означає H, заміщений алкіл або незаміщений нижчий алкіл;

де щонайменше один з R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁵ або R¹⁶ зв'язує вказаний лікарський засіб з L¹, якщо присутній, або з J.

89. Сполука за п.88, де R² означає незаміщений нижчий алкіл.

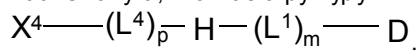
90. Сполука за п.87, де D має структуру:





де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент.

100. Сполука, яка має структуру:



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L^1 означає саморуйнівний лінкер;

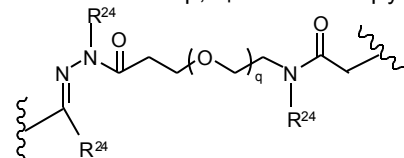
m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L^4 означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1;

H означає лінкер, що включає структуру:



де q дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6; і

де кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл; дана гідразінова структура може також утворювати п'яти-, шести- або семи-

членні цикли, і можна додавати додаткові компоненти, які утворюють множинні цикли.

101. Сполука за п.100, де H утворює 6-членний саморуйнівний лінкер при розкладанні.

102. Сполука за п.100, де H утворює два 5-членних саморуйнівних лінкери при розкладанні.

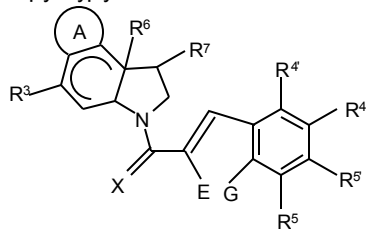
103. Сполука за будь-яким з пп.100-102, де D являє собою цитотоксичний лікарський засіб.

104. Сполука за будь-яким з пп.100-103, де D має хімічно реакційноздатну функціональну групу, вибрану з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфідрил і карбоксил.

105. Сполука за будь-яким з пп.100-104, де D вибраний з групи, яка включає: дуокарміцини, CC-1065, аналоги дуокарміцинів на основі CBI, аналоги дуокарміцинів на основі MCBI, аналоги дуокарміцинів на основі CCBI, доксорубіцин, кон'югати доксорубіцину, морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, доластатини, долестатин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристатин E, ауристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометилауристатин E (MMAE), AE-ефір 5-бензоїлвалеріанової кислоти (AEVB), тубулізини, дизоразол, епотилони, паклітаксел, доцетаксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, цемадотин, елеутеробін, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозин арабінозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидаїн, актиноміцин, даунорубіцин, кон'югати даунорубіцину, мітоміцин C, мітоміцин A, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, допофілотоксин, похідні допофілотоксину, етопозид, етопозидфос-

фат, вінкристин, таксол, таксотерретиноева кислота, масляна кислота, N-ацетилспермідин і камптотецин.

106. Сполука за будь-яким з пп.100-105, де D має структуру:



де циклічна система А означає компонент, вибраний із заміщеної або незаміщеної арильної, заміщеної або незаміщеної гетероарильної і заміщеної або незаміщеної гетероциклоалкільної групи;

Е і G являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гетероатома, простого зв'язку, або Е і G об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу;

Х означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} ;

R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає (=O), SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де

R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл; заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$, SR^{12} і $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$, в яких

R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

R^4 , R^5 і R^6 являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$, де

n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи замі-

щену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

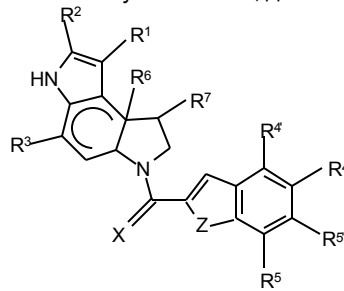
R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $\text{-CH}_2\text{-}$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де

X^1 означає відхідну групу,

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F.

107. Сполука за п.106, де D має структуру:



де

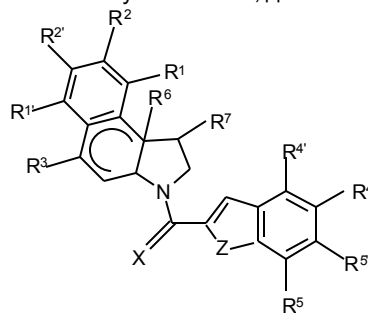
Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, NR^9R^{10} , $\text{NR}^9\text{NHR}^{10}$ і OR^9 , в яких R^9 і R^{10} являють собою компоненти, незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; і

R^2 означає Н, заміщений алкіл або незаміщений нижчий алкіл; де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Н.

108. Сполука за п.107, де R^2 означає незаміщений нижчий алкіл.

109. Сполука за п.106, де D має структуру:



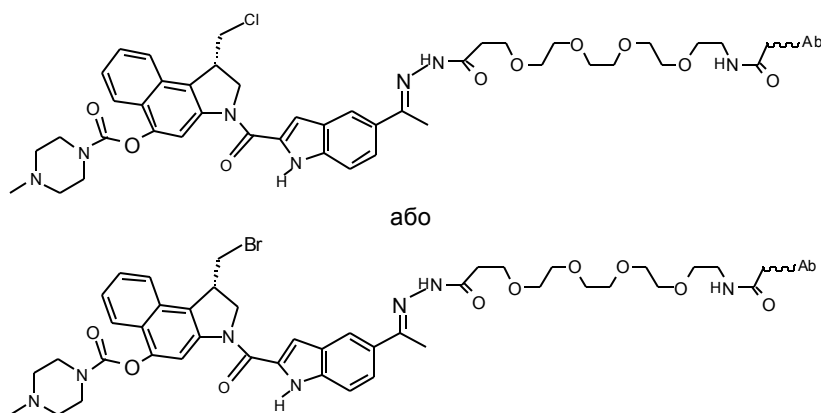
де

Z означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає Н, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 ,

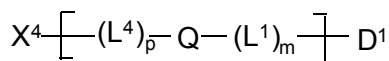
де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких

R^9 і R^{10} означають компоненти незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;
 R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $C(O)R^8$, де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких
 R^9 і R^{10} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;
 R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси; і
 R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з H.



де Ab означає антитіло або його фрагмент.

118. Сполука формули:



де

L^1 означає саморуїнівний лінкер;

m дорівнює цілому числу 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

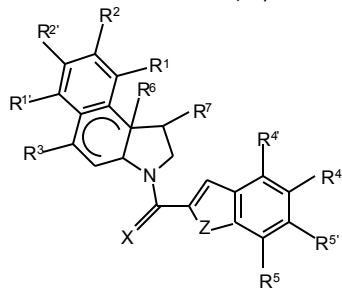
L^4 означає лінкерний компонент, де L^4 не містить карбоної ацильної групи, безпосередньо приєднаної до N-кінця (AA^1);

p дорівнює 0 або 1;

X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

Q означає відщеплюваний лінкер; і

D^1 являє собою ліки, що мають наступну формулу:



де X і Z означають компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR^{23} ;

110. Сполука за будь-яким з пп.100-109, де L^4 містить нециклічний фрагмент.

111. Сполука за будь-яким з пп.100-110, де L^4 підвищує розчинність сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 .

112. Сполука за будь-яким з пп.100-111, де L^4 знижує агрегацію сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 .

113. Сполука за будь-яким з пп.100-112, де L^4 містить поліетиленглікольний фрагмент.

114. Сполука за п.113, де поліетиленглікольний фрагмент містить 3-12 ланок, що повторюються.

115. Сполука за п.114, де поліетиленглікольний фрагмент містить 2-6 ланок, що повторюються.

116. Сполука за п.115, де поліетиленглікольний фрагмент містить 4 ланки, що повторюються.

117. Сполука за п.109, що має структуру:

R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $C(O)R^8$ або CO_2R^8 ;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $C(O)R^8$;

де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , і R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси;

R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл,

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} і $SiR^{12}R^{13}R^{14}$, в яких R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компо-

нентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} і R^{13} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Q , R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає CH_2-X^1 або $-CH_2-$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де

X^1 означає відхідну групу,

R^4 , R^4 , R^5 і $R^{5'}$ являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$ і $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

де R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

і R^{24} і R^{25} незалежно вибрані з незаміщеного алкілу,

де щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 і $R^{5'}$ означає $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$.

119. Сполука за п.118, де n дорівнює 2.

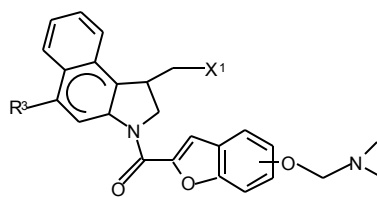
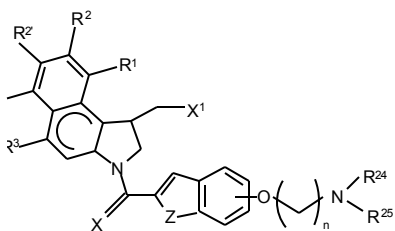
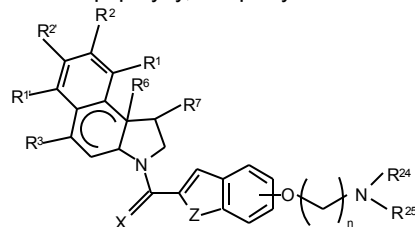
120. Сполука за будь-яким з пп.118 і 119, де R^{24} і R^{25} означають метил.

121. Сполука за будь-яким з пп.118-120, де R^4 , R^5 і $R^{5'}$ означають H, і R^4 означає $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$.

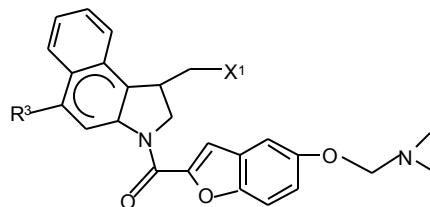
122. Сполука за п.121, де R^4 означає $O(CH_2)_2N(CH_3)_2$.

123. Сполука за будь-яким з пп.118-122, де R^1 , R^1 , R^2 і R^2 означають H.

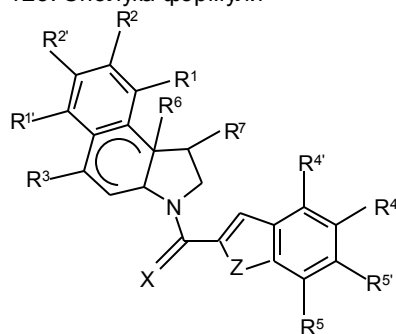
124. Сполука за будь-яким з пп.118-123, де ліки D¹ мають формулу, вибрану з:



i



125. Сполука формули



де X і Z незалежно вибрані з O, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $C(O)R^8$ або CO_2R^8 ,

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $C(O)R^8$, кожний R^8 означає компонент, незалежно вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , і R^9 і R^{10} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, незаміщений гетероалкіл, ціано або алкокси; R^2 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або незаміщений гетероалкіл,

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} і $SiR^{12}R^{13}R^{14}$, в яких R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, або R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $-\text{CH}_2-$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де X^1 означає відхідну групу.

R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, NC(O)R^{15} , $\text{OC(O)NR}^{15}\text{R}^{16}$, OC(O)OR^{15} , C(O)R^{15} , SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

і R^{24} і R^{25} незалежно вибрані з незаміщеного алкілу,

де щонайменше один з R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ означає $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$.

126. Сполука за п.125, де R^4 означає $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$.

127. Сполука за п.126, де R^4 означає $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

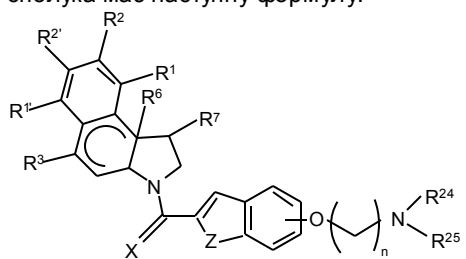
128. Сполука за п.127, де $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ означають Н.

129. Сполука за будь-яким з пп.125-128, в якому R^6 відсутній і R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$, де X^1 означає F, Cl або Br.

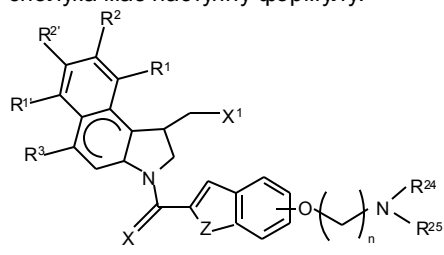
130. Сполука за будь-яким з пп.125-129, в якому R^1 , $R^{1'}$, R^2 і $R^{2'}$ означають Н.

131. Сполука за будь-яким з пп.125-130, в якому X означає O і Z означає O.

132. Сполука за будь-яким з пп.125-131, де дана сполука має наступну формулу:

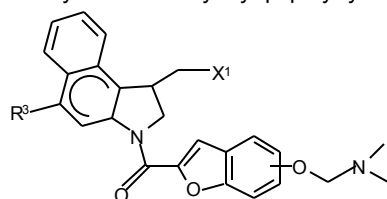


133. Сполука за будь-яким з пп.125-132, де дана сполука має наступну формулу:

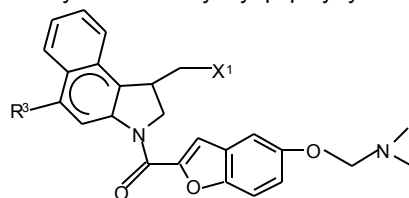


де X^1 означає F, Cl або Br.

134. Сполука за будь-яким з пп.125-133, де дана сполука має наступну формулу:



135. Сполука за будь-яким з пп.125-134, де дана сполука має наступну формулу:



136. Фармацевтичний препарат, що містить сполуку за будь-яким з пп.1-135 і фармацевтично прийнятний носій.

137. Спосіб знищення клітини, причому вказаний спосіб включає введення у вказану клітину деякої кількості сполуки за будь-яким з пп.1-135, достатньої для загибелі вказаної клітини.

138. Спосіб по п.137, де клітина являє собою пухлинну клітину.

139. Спосіб уповільнення або припинення росту пухлини у пацієнтів-ссавців, що включає введення вказаному суб'єкту деякої кількості сполуки за будь-яким з пп.1-135, достатньої для уповільнення або припинення росту.

Дана заявка затверджує пріоритетну перевагу попередніх патентних заявок [US 60/572667, US 60/661174 і US 60/669871], які включені тут як посилання.

Даний винахід стосується лінкерів, які приєднуються до ліків і ліганду і відщеплюються *in vivo*. Лінкери використовують при одержанні проліків і

кон'югатів цитотоксинів даного винаходу, а також інших діагностичних і терапевтичних компонентів.

Багато які терапевтичні агенти, особливо ті, які особливо ефективні в хіміотерапії раку, часто демонструють високу токсичність *in vivo*, головним чином, токсичність відносно головного мозку і слизової оболонки, а також хронічну кардіологічну і неврологічну токсичність. Така висока токсичність

може обмежувати їх застосування. Для більшої ефективності проти пухлинних клітин і зниження кількості і тяжкості побічних ефектів (токсичності, деструкції непухлинних клітин та інш.) потрібне проведення розробки нових більш безпечних специфічних терапевтичних агентів, особливо, протипухлинних агентів.

Іншою складністю застосування деяких неясних терапевтичних агентів є їх менша (у порівнянні з оптимальною) стабільність в плазмі. Внаслідок додавання функціональних груп для стабілізації даних сполук одержують істотне зниження активності. Таким чином, бажано ідентифікувати способи стабілізації сполук, зберігаючи при цьому прийнятні рівні терапевтичної активності.

Пошук більш селективних цитотоксичних агентів був надзвичайно активним протягом багатьох десятиріч, при цьому однією з основних причин невдач в лікуванні раку є обмежуюча дозу токсичність (тобто небажана дія цитотоксинів на нормальні тканини). Наприклад, відомо, що CC-1065 і дуокарміцини є надзвичайно сильнодіючими цитотоксинами.

CC-1065 був уперше виділений з *Streptomyces zelensis* в 1981 Upjohn Company [Hanka та інш., J. Antibiot. 31: 1211 (1978); Martin та інш., J. Antibiot. 33: 902 (1980); Martin та інш., J. Antibiot. 34: 1119 (1981)] і, як виявлено, володіє сильною протипухлинною і протимікробною активністю *in vitro* і на експериментальних тварин [Li та інш., Cancer Res. 42: 999 (1982)]. CC-1065 зв'язується з двонитковою В-ДНК в малій борозенці [Swenson та інш., Cancer Res. 42: 2821 (1982)] з переважною послідовністю 5'-d(AGNTTA)-3' і 5'-(AAAAA)-3' і алкілує N3-положення 3'-аденіну по його лівосторонній CPl-ланці, присутній в молекулі [Hurley та інш., Science 226: 843 (1984)]. Незважаючи на його сильну і широку протипухлинну дію, CC-1065 не можна використовувати на людях, оскільки він є причиною відстроченої смерті у експериментальних тварин.

Фахівцям відомі багато які аналоги і похідні CC-1065 і дуокарміцинів. Є огляди з досліджень структури, синтезу і властивостей багатьох сполук. Дивись, наприклад, роботи [Boger та інш., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996) і Boger та інш., Chem. Rev. 97: 787 (1997)].

Група дослідників з Kuowa Hakko Kogyo Co, Ltd. одержала ряд похідних CC-1065. Дивись, наприклад, [патенти США №№5101038; 5641780; 5187186; 5070092; 5703080; 5070092; 5641780; 5101038 і 5084468; опубліковану РСТ-заявку WO 96/10405 і опубліковану Європейську заявку 0 537 575 A1].

Компанія Upjohn (Pharmacia Upjohn) також активно працювала над одержанням похідних CC-1065. Дивись, наприклад, [патенти США №№5739350; 4978757; 5332837 і 4912227].

Дослідження фокусувалось також на розробці нових терапевтичних агентів, які мають форму проліків, тобто сполук, які здатні перетворюватись в ліки (активні терапевтичні сполуки) *in vivo* при деяких хімічних або ферментативних модифікаціях їх структури. З метою зниження токсичності дану конверсію переважно обмежують місцем впливу або цільовою тканиною і не проводять по кровото-

кій системі або нецільовій тканині. Однак навіть проліки є проблематичними, оскільки багато які характеризуються низькою стабільністю в крові і сироватці внаслідок присутності ферментів, які руйнують або активують проліки до того, як вони досягнуть місця необхідного впливу в організмі пацієнта.

Bristol-Myers Squibb описує особливі лізосомальні кон'югати протипухлинних лікарських засобів, що руйнуються ферментом. Дивись, наприклад, [патент США №6214345]. Даний патент стосується амінобензилоксикарбонілу.

Компанія Seattle Genetics опублікувала [патентні заявки США 2003/0096743 і 2003/0130189], які описують пара-амінобензильні прості ефіри в агентах доставки ліків. Описані в даних заявках лінкери обмежені композиціями амінобензильних ефірів.

Інші групи фахівців також описують лінкери. Дивись, наприклад, [роботи de Groot та інш., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot та інш., J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot та інш., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl та інш., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik та інш., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998)]. Дані лінкери включають спейсер у вигляді амінобензильного простого ефіру, системи з довгастим електронним каскадом і спейсерні системи, які циклізуються, спейсери, що усуваються при циклізації, наприклад, ω -амінокарбоніли і пара-амінобензилоксикарбонільний лінкер.

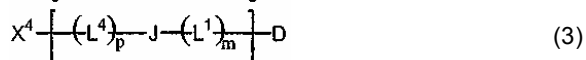
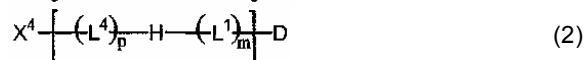
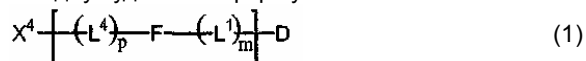
Стабільність цитотоксичних лікарських препаратів, включаючи *in vivo* стабільність, є ще одним важливим предметом, який потребує розгляду. Крім того, токсичність багатьох сполук робить їх менш придатними, так що потрібні композиції, які будуть знижувати токсичність ліків, наприклад, проліки, що розщеплюються. Отже, незважаючи на успіхи в даній галузі, залишається потреба в розробці поліпшених терапевтичних агентів для лікування ссавців і людей, зокрема, більш специфічних цитотоксинів, які демонструють високу специфічність дії, знижену токсичність і поліпшену стабільність в крові у порівнянні з відомими сполуками аналогічної структури. Даний винахід направлений на ці цілі.

Даний винахід стосується кон'югатів ліки-ліганд, в яких ліки і ліганд пов'язані пептидним, гідразинним або дисульфідним лінкером. Дані кон'югати являють собою сильнодіючі цитотоксини, які можна селективно доставити до цікавлячого місця дії в активному вигляді і потім розщепити з вивільненням активних ліків. Нові лінкерні ділянки за даним винаходом можуть відщеплюватись від цитотоксичних ліків, наприклад, ферментативними або відновними способами *in vivo*, вивільняючи активну лікарську частину з похідних проліків. Крім того, даний винахід включає кон'югати лінкерних ділянок і цитотоксинів даного винаходу і кон'югати лінкерних ділянок, цитотоксину і направляючого агента, наприклад, антитіла або пептиду.

Винахід також стосується груп, придатних для стабілізації терапевтичних агентів і маркерів. Стабілізуючі групи вибрані, наприклад, таким чином, щоб обмежувати кліренс і метаболізм терапевтич-

ного агента або маркера ферментами, які можуть бути присутніми в крові або нецільовій тканині. Стабілізуючі групи можуть служити для блокування розкладання агента або маркера і також можуть діяти, забезпечуючи інші фізичні характеристики агента або маркера, наприклад, підвищення розчинності сполуки або зниження агрегаційних властивостей сполуки. Стабілізуюча група може також поліпшувати стабільність агента або маркера при зберіганні у вигляді препаративної форми або самого по собі.

Перший аспект винаходу стосується цитотоксичної сполуки ліки-ліганд, що має структуру, відповідну будь-якій з формул 1-3:



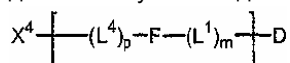
в яких символ D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфгідрил, карбоксил, альдегід і кетон.

Символ L^1 означає саморуйнівний спейсер, де m дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

Символ X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти.

Символ L^4 означає лінкерний компонент, і p дорівнює 0 або 1. L^4 являє собою фрагмент, який додає кон'югатам підвищеної розчинності або знижених агрегаційних властивостей. Приклади компонентів L^4 включають заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероалкіл, або незаміщений гетероалкіл, кожний з яких може являти собою лінійний, розгалужений або циклічний, позитивно або негативно заряджений такий амінокислотний полімер, як полілізин або поліаргенін, або інший полімер, наприклад, поліетиленгліколь.

Символи F, H і J означають лінкери, які описані тут далі. В одному варіанті винахід відноситься до кон'югату з пептидним лінкером структури:



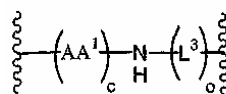
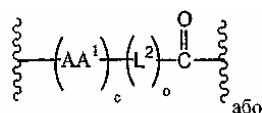
де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L^1 означає саморуйнівний лінкер;

m дорівнює цілому числу 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

F означає лінкер, що містить структуру:



де

AA^1 означає один або більше компонентів, незалежно вибрані з групи, яка включає природні амінокислоти і штучні α -амінокислоти;

c дорівнює цілому числу від 1 до 20;

L^2 означає саморуйнівний лінкер;

L^3 означає спейсерну групу, що включає первинний або вторинний амін або карбоксильну функціональну групу, в якій присутній L^3 , m дорівнює 0, і амін групи L утворює амідний зв'язок з підвішеною карбоксильною функціональною групою від D, або карбоксил від L^3 утворює амідний зв'язок з підвішеною аміною функціональною групою від D;

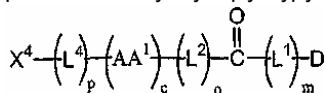
o дорівнює 0 або 1;

L^4 означає лінкерний компонент, в якому L^4 не має безпосередньо приєднаної до N-кінця компонента $(AA^1)_c$ карбоксильної ацильної групи;

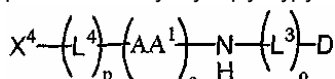
p дорівнює 0 або 1; і

X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти.

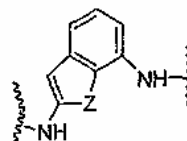
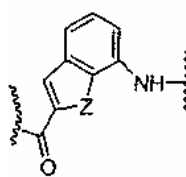
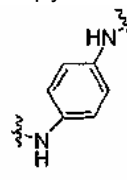
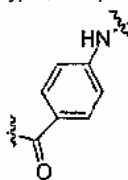
В одному варіанті, кон'югат з пептидним лінкером має наступну структуру:

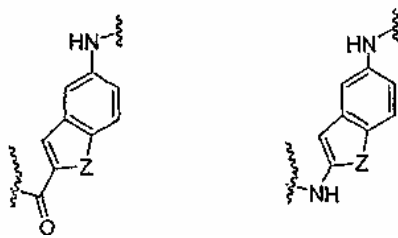


В іншому варіанті, кон'югат з пептидним лінкером має наступну структуру:



У переважному варіанті L^3 включає ароматичну групу. Наприклад, L^3 може включати бензойну кислотну групу, анілінову групу або індольну групу. Необмежувальні приклади $-L^3-NH-$ включають структури, вибрані з наступних груп:



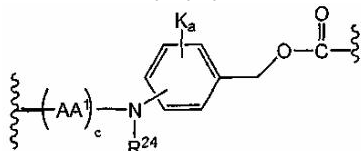


де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR²³, і

де R²³ означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу.

У переважних варіантах пептидного лінкера, (AA)¹_c являє собою пептидну послідовність, що розщеплюється протеазою, експресованою в пухлинній тканині. Переважною протеазою є лізосомальна протеаза. У переважних варіантах с дорівнює цілому числу від 2 до 6 або з дорівнює 2, 3 або 4. В деяких варіантах амінокислота в (AA)¹_c, розташована ближче усього до лікарської частини, вибрана з групи, яка включає: Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gin, Glu, Gly, He, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr і Val. У переважних варіантах (AA)¹_c означає пептидну послідовність, вибрану з групи, яка включає Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нітро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 1), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 2) і Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 3). В особливо переважних варіантах, (AA)¹_c означає Val-Cit або Val-Lys.

У деяких переважних варіантах пептидний лінкер F має структуру:



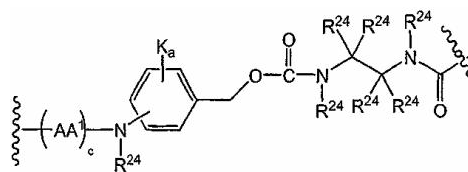
де R²⁴ вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

кожний K означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO₂, NR²¹R²², NR²¹COR²², OCONR²¹R²², OCOR²¹ і OR²¹,

де R²¹ і R²² незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл;

а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4.

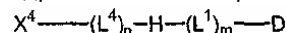
В інших переважних варіантах -F-(L¹)_m- має структуру:



де

кожний R²⁴ означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл.

Інший аспект винаходу стосується кон'югатів з гідразиновими лінкером структури:



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тіол, карбоксил, альдегід і кетон;

L¹ означає саморуйнівний лінкер;

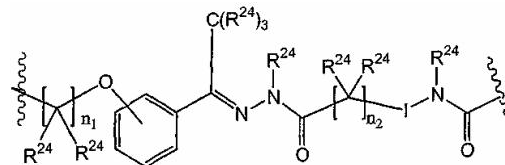
m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

X⁴ означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L⁴ означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1;

H означає лінкер, що включає структуру:



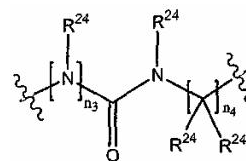
де

p₁ дорівнює цілому числу від 1 до 10;

p₂ дорівнює 0, 1 або 2;

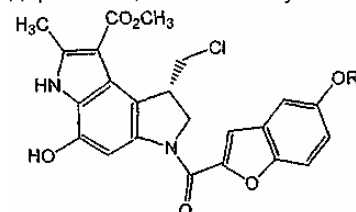
кожний R²⁴ означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл; і

I означає або зв'язок, або:



де p₃ дорівнює 0 або 1 за умови, що якщо p₃ дорівнює 0, то p₂ не дорівнює 0 і p₄ дорівнює 1, 2 або 3,

де якщо I означає зв'язок, щ дорівнює 3 і p₂ дорівнює 1, D не може бути



де R означає Me або $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NMe}_2$.

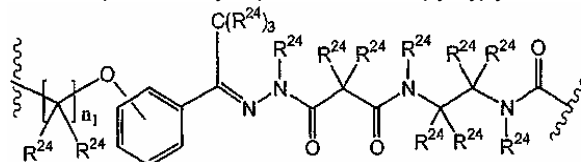
У деяких переважних варіантах заміщення у фенільному кільці є пара-заміщенням. У деяких переважних варіантах, p_1 дорівнює 2, 3 або 4 або p_2 дорівнює 3 або p_2 дорівнює 1.

У деяких варіантах, l означає зв'язок. В інших варіантах p_3 дорівнює 0 і p_4 дорівнює 2.

Різноманітні аспекти винаходу стосуються гідразинних лінкерів H, які можуть утворювати 6-членний лінкер, саморуйнівний при розкладанні, або два 5-членних лінкери, саморуйнівних при розкладанні, або один 5-членний лінкер, саморуйнівний при розкладанні, або один 7-членний лінкер, саморуйнівний при розкладанні, або 5-членний саморуйнівний лінкер і 6-членний лінкер, саморуйнівний при розкладанні.

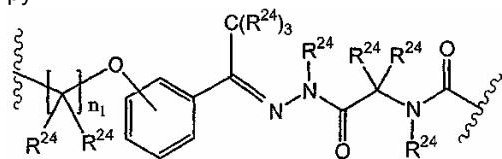
У переважному варіанті H має гемінальне диметильне заміщення.

У переважному варіанті H має структуру:



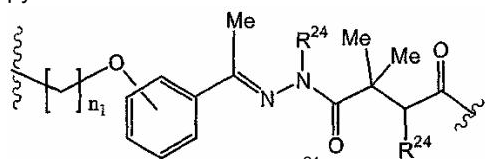
Переважно p_1 дорівнює 2, 3 або 4, більш переважно p_1 дорівнює 3. Переважно кожний R^{24} незалежно вибраний з CH_3 і H. У деяких переважних варіантах кожний R^{24} означає H.

В іншому переважному варіанті H має структуру:



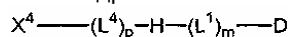
Переважно p_1 дорівнює 3. Переважно кожний R^{24} незалежно вибраний з CH_3 і H.

В інших переважних варіантах H має структуру:



Переважно кожний R^{24} незалежно означає H або заміщений або незаміщений алкіл.

Інший аспект винаходу відноситься до кон'югатів з гідразинними лінкерами структури:



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L^1 означає саморуйнівний лінкер;

m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

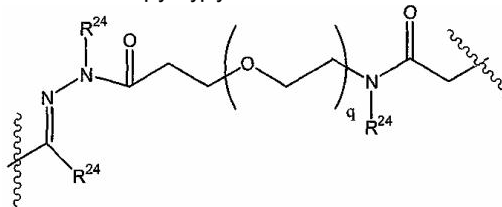
X означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні

групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L^4 означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1; i

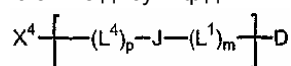
H має структуру:



де q дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6; i

кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл.

Ще один аспект винаходу відноситься до кон'югатів з дисульфідними лінкерами структури:



де

D означає лікарську частину, що має підвішену до свого основного ланцюга хімічно реакційноздатну функціональну групу, причому вказана функціональна група вибрана з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, тиол, карбоксил, альдегід і кетон;

L^1 означає саморуйнівний лінкер;

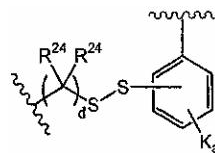
m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6;

X^4 означає компонент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти;

L^4 означає лінкерний компонент;

p дорівнює 0 або 1;

J означає лінкер, що має структуру:



де

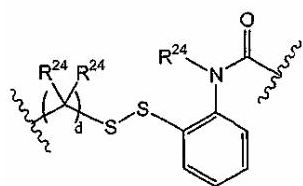
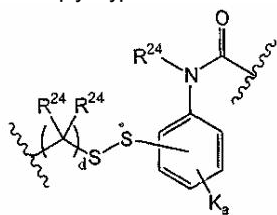
кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

кожний K означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, $\text{NR}^{21}\text{COR}^{22}$, $\text{OCONR}^{21}\text{R}^{22}$, OCOR^{21} і OR^{21} ;

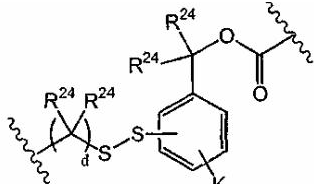
де

R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл і незаміщений гетероциклоалкіл;

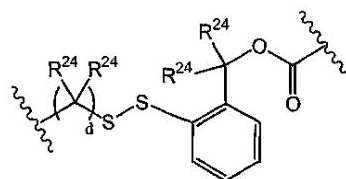
а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4; і
d дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6.
У різних варіантах J може мати одну з наступних структур:



де d дорівнює 1 або 2;



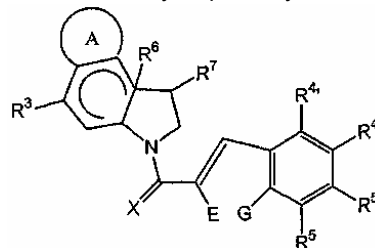
або



У всіх попередніх лінкерних кон'югатах D переважно являє собою цитотоксичний лікарський засіб. У переважних варіантах D має хімічно реакційноздатну функціональну групу, вибрану з групи, яка включає первинний або вторинний амін, гідроксил, сульфгідрил і карбоксил. Необмежувальні приклади переважних лікарських засобів D включають дуокарміцини і аналоги і похідні дуокарміцинів, CC-1065, аналоги дуокарміцинів на основі CBI, аналоги дуокарміцинів на основі MCBI, аналоги дуокарміцинів на основі CCBI, доксорубіцин, кон'югати доксорубіцину, морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, доластатини, доле-статин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтан-зин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристатин E, ау-ристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометилауристатин E (MMAE), AE-складний ефір 5-бензоілвалеріанової кислоти (AEVB), тубу-лізини, дизоразол, епотилони, паклітаксел, доце-таксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, це-мадотин, елеутеробін, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозин арабінозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидеїн, актиноміцин, даунорубі-цин, кон'югати даунорубіцину, мітоміцин C, мітомі-цин A, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин,

допофілотоксин, похідні допофілотоксину, етопо-зид, етопозидфосфат, вінкристин, таксол, таксо-тер-ретиноєва кислота, масляна кислота, N⁸-ацетил спермі дин і камптотецин.

У переважному варіанті D являє собою аналог або похідне дуокарміцину, яке має структуру:



де циклічна система A означає компонент, ви-браний із заміщеної або незаміщеної арильної, заміщеної або незаміщеної гетероарильної і замі-щеної або незаміщеної гетероциклоалкільної гру-пи;

E і G являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гете-роатома, простого зв'язку, або E і G об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщено-го або незаміщеного арилу, заміщеного або неза-міщеного гетероарилу і заміщеного або незаміще-ного гетероциклоалкілу;

X означає компонент, вибраний з O, S і NR²³,

R²³ означає компонент, вибраний з H, заміще-ного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R³ означає компонент, вибраний з групи, яка включає (=O), SR¹¹, NHR¹¹ і OR¹¹, де

R¹¹ означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, C(O)R¹²R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²R¹³, SR¹² і SiR¹²R¹³R¹⁴,

в яких

R¹², R¹³ і R¹⁴ означають компоненти, незалеж-но вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкі-лу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R¹² і R¹³ разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюю-чи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну кільцеву систему, яка має від 4 до 6 елементів, що необов'язково включає два або більше гетероато-мів;

R⁴, R⁴, R⁵ і R⁵ означають компоненти, неза-лежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, неза-міщений арил, заміщений гетероарил, незаміще-ний гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, не-заміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO₂, NR¹⁵R¹⁶, NC(O)R¹⁵, OC(O)NR¹⁵R¹⁶, OC(O)OR¹⁵, C(O)R¹⁵, SR¹⁵, OR¹⁵, CR¹⁵=NR¹⁶ і O(CH₂)_nN(CH₃)₂, де

n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R¹⁵ і R¹⁶ незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незамі-щеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщено-го арилу, заміщеного або незаміщеного гетеро-

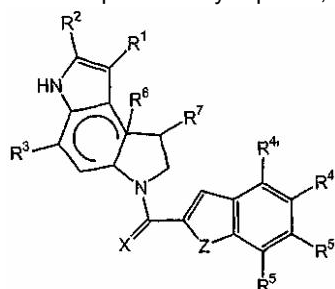
арилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну кільцеву систему, яка має від 4 до 6 елементів, що необов'язково включає два або більше гетероатомів;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $\text{-CH}_2\text{-}$, об'єднаний у вказане циклопропільне кільце з R^6 , де

X^1 означає відхідну групу, де щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F, H, або J.

У переважному варіанті, D має структуру:



де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR^{23} ,

де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, C(O)R^8 або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, NR^9R^{10} , $\text{NR}^9\text{NHR}^{10}$ і OR^9 ,

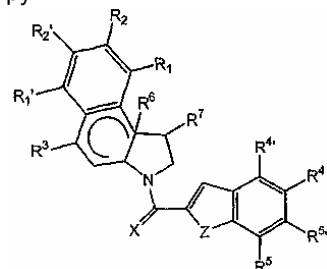
в яких R^9 і R^{10} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу; і

R^2 означає H, заміщений алкіл або незаміщений нижчий алкіл;

в якому щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F, H або J.

У вказаному вище переважному варіанті R^2 означає незаміщений нижчий алкіл.

В іншому переважному варіанті D має структуру:



де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR^{23} ,

де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, C(O)R^8 або CO_2R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких

R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або C(O)R^8 , де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , в яких

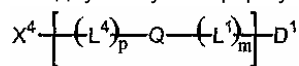
R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси; і

R^2 означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, в якому щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з F, H або J.

У всіх попередніх структурах лінкерних кон'югатів L^4 переважно містить нециклічний фрагмент. L^4 переважно підвищує розчинність сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 , і/або L^4 знижує агрегацію сполуки у порівнянні зі сполукою, що не має L^4 . У переважному варіанті L^4 містить поліетиленглікольний фрагмент. Поліетиленглікольний фрагмент може містити, наприклад, 3-12 ланок, що повторюються, або 2-6 ланок, що повторюються, або, більш переважно, 4 повторюваних ланки.

Ще один аспект винаходу стосується цитотоксичної сполуки ліки-ліганд, що має структуру, відповідну наступній формулі:



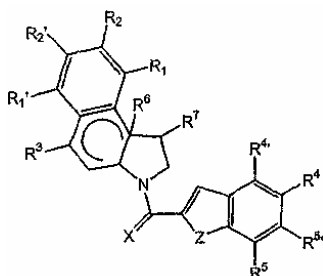
де символ L^1 являє собою саморуйнівний спейсер, де m дорівнює цілому числу 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6. і

Символ X^4 означає елемент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти.

Символ L^4 означає лінкерний компонент, і p дорівнює 0 або 1. L^4 означає компонент, який додає кон'югатам підвищену розчинність або знижені агрегаційні властивості. Приклади компонентів L^4 включають заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероалкіл або незаміщений гетероалкіл, кожний з яких може бути лінійним, розгалуженим або циклічним, позитивно або негативно зарядженою полімерною амінокислотою, такою як полілізин або поліаргінін, або іншими полімерами, наприклад, поліетиленгліколем.

Символ Q означає відщеплюваний лінкер, що включає, але не обмежений цим, будь-які пептидні, ідіозононі і дисульфідні лінкери, описані тут. Відщеплювані лінкери включають лінкери, які можуть селективно відщеплюватись хімічним або біологічним способом і при відщепленні відділяти ліки D^1 від X^4 .

Символ D^1 означає лікарський засіб, що має наступну формулу:



де X і Z означають компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR^{23} ;

R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 ;

R^{11} означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$;

де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , і R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано або алкокси;

R^2 означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл,

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$, SR^{12} і $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$, в яких R^{12} , R^{13} і R^{14} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 елементів, що необов'язково включає два або більше гетероатомів;

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} і R^{13} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Q,

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, то R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $\text{-CH}_2\text{-}$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де

X^1 означає відхідну групу,

R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 і $\text{R}^{5'}$ означають компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{NC}(\text{O})\text{R}^{15}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{15}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

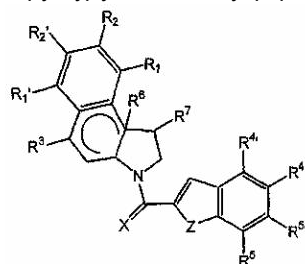
R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незамі-

щеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково включає два або більше гетероатомів;

і R^{24} і R^{25} незалежно вибрані з незаміщеного алкілу, і,

де щонайменше один з R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 і $\text{R}^{5'}$ означає $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$.

Ще один варіант представляє сполуку, що має структуру, відповідну формулі 1:



(1)

в якій X і Z незалежно вибрані з O, S і NR^{23} , де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ або CO_2R^8 ;

R^{11} означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $\text{C}(\text{O})\text{R}^8$;

кожний R^8 означає компонент, незалежно вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , і R^9 і R^{10} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, незаміщений гетероалкіл, ціано або алкокси;

R^2 означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або незаміщений гетероалкіл,

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де R^{11} означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12}\text{R}^{13}$, SR^{12} і $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$, в яких R^{12} , R^{13} і R^{14} означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, або R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 елементів, що необов'язково включає два або більше гетероатомів;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає $\text{CH}_2\text{-X}^1$ або $-\text{CH}_2$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де X^1 означає відхідну групу.

R^4 , R^4 , R^5 і R^5 означають компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, NC(O)R^{15} , $\text{OC(O)NR}^{15}\text{R}^{16}$, OC(O)OR^{15} , C(O)R^{15} , SR^{15} , OR^{15} , $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ і $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 елементів, що необов'язково включає два або більше гетероатомів;

і R^{24} і R^{25} незалежно вибрані з незаміщеного алкілу, і

де щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 означає $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$.

Ще один аспект винаходу стосується фармацевтичних препаратів. Такі препарати звичайно містять сполуки-кон'югат за даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

Ще один аспект винаходу стосується способів застосування сполук-кон'югатів за даним винаходом. Наприклад, винахід стосується способу знищення клітини, в якому сполуку-кон'югат за даним винаходом вводять в клітину в кількості, достатній для її загибелі. У переважному варіанті клітина являє собою пухлинну клітину. В іншому варіанті винахід стосується способу уповільнення або припинення зростання пухлини у пацієнта-ссавця, в якому сполуку-кон'югат за даним винаходом вводять пацієнту в кількості, достатній для уповільнення або припинення зростання пухлини.

Інші аспекти, переваги і цілі винаходу будуть ясні з огляду наведеного нижче докладного опису.

Скорочення

Скорочення "Ala", що використовується тут, відноситься до аланіну.

"Boc" відноситься до трет-бутилоксикарбонілу.

"CPI" відноситься до циклопропапіролоіндолу.

"Cbz" означає карбобензокси.

Скорочення "DXM", що використовується тут, відноситься до дихлорметану.

"DDQ" відноситься до 2,3-дихлор-5,6-диціано-1,4-бензохінон.

"DIPEA" означає діізопропілетанамін.

"DMA" означає N,N'-диметилетилендіамін.

"RBF" означає круглодонну колбу.

"DMFA" означає N,N-диметилформамід.

"HATU" означає N-[[диметиламіно]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридин-1-іл]метиле- N -метилметанамінийгексафторфосфат N -оксид.

Символ "E", що використовується тут, означає ферментативно-відщеплювану групу.

"EDCI" означає 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіімід.

Скорочення "Fmoc", що використовується тут, означає 9-флуоренілметилоксикарбоніл.

"Fmoc" означає 9-флуоренілметоксикарбоніл.

"HOAt" означає 7-аза-і-гідроксибензотриазол.

"Leu" означає лейцин.

"PABA" означає пара-амінобензойну кислоту.

"PEG" означає поліетиленгліколь.

"PMB" означає пара-метоксibenзил.

"TBAF" означає тетрабутиламонійфторид.

Скорочення "TBSO" означає трет-бутилдиметилсиліловий ефір.

Скорочення "TEA", що використовується тут, відноситься до триетиламіну.

"TFA" відноситься до трифтороцтової кислоти.

Символ "Q" відноситься до терапевтичного агента, діагностичного агента або мітки, що детектується.

Визначення

Якщо не визначено по-іншому, всі технічні і наукові терміни, що використовуються тут, звичайно мають таке ж значення, як звичайно розуміється фахівцями в галузі, до якої належить даний винахід. Взагалі, номенклатура, що використовується тут, і описані нижче лабораторні методики з культивування клітин, молекулярної генетики, органічної хімії і хімії нуклеїнових кислот і гібридизації добре відомі і звичайно використовуються в даній галузі. Для синтезу нуклеїнових кислот і пептидів використовують стандартні методики. Звичайно ферментативні реакції і стадії очищення виконують згідно з інструкціями виробників. Методики і процедури звичайно виконують згідно із загальноприйнятими в даній галузі способами і різними посиланнями (в більшості випадків дивись роботу [Sambrook та інш., Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.], яка включена тут як посилання), які наведені в тексті даного документа. Номенклатура, що використовується тут, і описані нижче лабораторні методики з аналітичної хімії і органічного синтезу добре відомі і звичайно використовуються в даній галузі. Для хімічного синтезу і хімічного аналізу використовують стандартні методики або їх модифікації.

Вираз "терапевтичний агент" призначений для позначення сполуки, яка, якщо присутня в терапевтично ефективній кількості, виробляє бажаний терапевтичний ефект у ссавця. Для лікування карциноми бажано, щоб терапевтичний агент також був здатний входити в клітину-мішень.

Вираз "цитотоксин" призначений для позначення терапевтичного агента, що надає необхідний цитотоксичний вплив на ракові клітини. Вираз "цитотоксичний" має на увазі, що агент затримує зростання або знищує клітини. Типові цитотоксини включають (як приклад, а не обмеження) комбретастатини, дуокарміцини, протипухлинні антибіотики CC-1065, антрацикліни і споріднені сполуки. Інші цитотоксини включають мікотоксини, рицин і його аналоги, каліхеаміцини, доксирубіцин і мейтанзиноїди.

Термін "проліки" і вираз "кон'югат ліків" використовуються тут взаємозамінно. Обидва вирази відносяться до сполуки, яка є відносно безпечною для клітин, знаходячись у вигляді кон'югату, але яка селективно руйнується до фармакологічно активної форми в певних умовах, наприклад, ферментами, розташованими всередині або поблизу від клітин-мішеней.

Термін "маркер" призначений для позначення сполуки, корисної при характеристиці пухлин або іншого медичного стану, наприклад, діагнозу, розвитку пухлини і при дослідженні факторів, секретованих пухлинними клітинами. Маркери вважаються підмножиною "діагностичних агентів".

Термін "селективний", що використовується в зв'язку з ферментативними засобами розкладання, означає, що швидкість розкладання лінкерного фрагмента більше, ніж швидкість розкладання пептиду, що має випадкову послідовність амінокислот.

Вираз "направляюча група" і "направляючий агент" призначені для позначення фрагмента, який: (1) здатний направити об'єкт, до якого він приєднаний (наприклад, терапевтичний агент або маркер), в клітину-мішень, наприклад, в пухлинну клітину специфічного типу, або (2) переважно активується в тканині-мішені, наприклад, в пухлині. Направляюча група або направляючий агент може являти собою невелику молекулу, яка, як мається на увазі, включає непептиди і пептиди. Направляюча група може також являти собою макромолекулу, яка включає сахариди, лектини, рецептори, ліганд для рецепторів, білки, такі як BSA, антитіла і т. д. В переважному варіанті даного винаходу, направляюча група являє собою антитіло або фрагмент антитіла, більш переважно моноклональне антитіло або фрагмент моноклонального антитіла.

Вираз "саморуйнівний спейсер" відноситься до біфункціонального хімічного фрагмента, який здатний ковалентно зв'язувати два хімічних компоненти в нормально стабільну молекулу. Саморуйнівний спейсер здатний спонтанно відділятися від другого фрагмента, якщо руйнується зв'язок з першим фрагментом.

Вираз "мітка, що детектується" призначений для позначення фрагмента, що має детектовану фізичну або хімічну властивість.

Вираз "відщеплювана група" призначений для позначення фрагмента, який є нестабільним *in vivo*. Переважна "відщеплювана група" допускає активацію маркера або терапевтичного агента при відщепленні маркера або агента від залишку кон'югату. Оперативно визначено, що лінкер переважно відщеплюється *in vivo* в біологічному середовищі. Розкладання може відбуватись внаслідок будь-якого процесу без обмеження, наприклад, ферментативного, відновного, рН та інш. Переважно вибирати відщеплювану групу таким чином, щоб активація відбувалась в місці необхідного впливу, яке може знаходитись всередині або поруч з клітинами-мішенями (наприклад, клітинами карциноми) або тканинами, наприклад, за місцем терапевтичної дії або активності маркера. Таке розкладання може бути ферментативним, і типові відщеплювані групи включають природні амінокис-

слоти або пептидні послідовності, які мають на кінці природну амінокислоту і приєднані до лінкера по своєму карбоксильному кінцю. При тому, що міра підвищення швидкості розкладання не є критичною для винаходу, переважними прикладами відщеплюваних лінкерів є ті, в яких щонайменше приблизно 10% відщеплюваних груп відщеплюються в потоку крові за 24 години після введення, найбільш переважно щонайменше приблизно 35%.

Термін "ліганд" означає будь-яку молекулу, яка специфічно зв'язує або реакційноздатним чином асоціюється або комплексується з рецептором, субстратом, антигенною детермінантою або іншим сайтом зв'язування на клітині-мішені або тканині-мішені. Приклади лігандів включають антитіла і їх фрагменти (наприклад, моноклональне антитіло або його фрагмент), ферменти (наприклад, фібринолітичні ферменти), модифікатори біологічних реакцій (наприклад, інтерлейкіни, інтерферони, еритропоєтин або колонієстимулюючі фактори), пептидні гормони і їх антигензв'язувальні фрагменти.

Вираз "гідразиновий лінкер" і "гідразиновий лінкер, який самоциклізується" використовують тут взаємозамінно. Дані терміни відносяться до лінкерного фрагмента, який при зміні умов, наприклад, зсуві рН, зазнає циклізації і утворює один або більше циклів. Гідразиновий фрагмент перетворюється в гідразон, коли приєднується. Дане приєднання може відбуватись, наприклад, за допомогою взаємодії з кетонною групою на фрагменті L⁴. Отже, для опису лінкера даного винаходу можна також використати вираз "гідразоновий лінкер" через дану конверсію в гідразон при приєднанні.

Вираз "п'ятичленний гідразиновий лінкер" або "5-членний гідразиновий лінкер" відноситься до гідразинвмісних молекулярних фрагментів, які при зміні умов, наприклад, зсуві рН, піддаються реакції циклізації і утворюють один або більше 5-членних циклів.

По-іншому, даний п'ятичленний лінкер можна аналогічно описати як п'ятичленний гідразоновий лінкер або 5-членний гідразоновий лінкер.

Вираз "шестичленний гідразиновий лінкер" або "6-членний гідразиновий лінкер" відноситься до гідразинвмісних молекулярних фрагментів, які, при зміні умов, наприклад, зсуві рН, піддаються реакції циклізації і утворюють один або більше 6-членних циклів. Даний шестичленний лінкер можна аналогічно описати як шестичленний гідразоновий лінкер або 6-членний гідразоновий лінкер.

Вираз "реакція циклізації", якщо відноситься до циклізації пептидного, гідразинового або дисульфідного лінкера, означає циклізацію даного лінкера в кільце та ініціювання розділення комплексу ліки-ліганд. Міру протікання реакції можна визначити *ex situ*, і завершити реакцію, при утворенні щонайменше 90%, 95% або 100% продукту.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовують тут взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Дані терміни застосовуються до амінокислотних полімерів, в яких один або більше амінокислотних залишків є штучними хімічними міметиками відповідної при-

родної амінокислоти, а також до природних амінокислотних полімерів і неприродних амінокислотних полімерів. Дані терміни включають також термін "антитіло".

Термін "амінокислота" відноситься до природних і синтетичних амінокислот, а також аналогів амінокислот і міметиків амінокислот, які діють аналогічно природним амінокислотам. Природні амінокислоти являють собою амінокислоти, кодовані генетичним кодом, а також ті амінокислоти, які пізніше піддають модифікації, наприклад, гідроксипролін, γ -карбоксиглутамат і О-фосфосерин. Аналоги амінокислот відносяться до сполук, які мають таку ж базову хімічну структуру, як і природна амінокислота, тобто, атоми α -вуглецю, які пов'язані з атомами водню, карбоксильну групу, аміногрупу і групу R, наприклад, гомосерин, норлейцин, метіонінсульфоксид, метіонінметилсульфоній. Такі аналоги мають модифіковані групи R (наприклад, норлейцин) або модифіковані пептидні основні ланцюги, але зберігають таку ж базову хімічну структуру як природна амінокислота. Зокрема, однією амінокислотою, яку можна використати є цитрулін, який являє собою попередник аргініну і включений в утворення сечовини в печінці. Міметики амінокислоти відносяться до хімічних сполук, які мають структуру, відмінну від загальної хімічної структури амінокислоти, але діють аналогічно природній амінокислоті. Вираз "штучна амінокислота" призначено для позначення стереохімічної форми "D" двадцяти природних амінокислот, описаних вище. Крім того, зрозуміло, що вираз штучна амінокислота включає гомологи природних амінокислот і синтетично модифіковані форми природних амінокислот. Синтетично модифіковані форми включають, але не обмежені цим, амінокислоти, що мають алкіленові ланцюги, укорочені або подовжені на два атоми вуглецю, амінокислоти, що включають необов'язково заміщені арильні групи, і амінокислоти, що містять галогеновані групи, переважно галогеновані алкільні і арильні групи. Якщо амінокислота приєднана до лінкера або кон'югату за даним винаходом, то вона присутня у вигляді "амінокислотного бічного ланцюга", де карбоксильна кислотна група амінокислоти замінена кетогрупою (C(O)). Таким чином, наприклад, аланіновий бічний ланцюг являє собою $-C(O)-CH(NH_2)-CH_3$ і так далі.

Амінокислоти і пептиди можуть бути захищені блокуючими групами. Блокуюча група являє собою атом або хімічний фрагмент, який захищає N-кінець амінокислоти або пептиду від небажаних реакцій, і може бути використана при синтезі кон'югату ліки-ліганд. Вона повинна залишатись приєднаною до N-кінця протягом синтезу і може бути видалена по завершенні синтезу кон'югату ліків за допомогою хімічних або інших умов, в яких досягається її селективне видалення. Блокуючі групи, придатні для захисту N-кінця, добре відомі в галузі хімії пептидів. Типові блокуючі групи включають, але не обмежені цим, водень, D-амінокислоту і карбобензоксид (Cbz) хлорид.

Термін "нуклеїнова кислота" відноситься до дезоксирибонуклеотидів або рибонуклеотидів і їх полімерів у вигляді одно- або двониткової форми.

Термін охоплює нуклеїнові кислоти, включаючи відомі нуклеотидні аналоги, або модифіковані залишки основного ланцюга, або сполуки, які є синтетичними, природними і неприродними, які мають аналогічні властивості зв'язування, як і нуклеїнова кислота, що розглядається, і які зазнають метаболізм аналогічно нуклеотидам, що розглядаються. Приклади таких аналогів включають (без обмеження) фосфоротіоати, фосфоамідати, метилфосфонати, хіральні метилфосфонати, 2-О-метилрибонуклеотиди, пептид-нуклеїнові кислоти (PNA).

Якщо не указано по-іншому, конкретна послідовність нуклеїнових кислот також повністю охоплює її консервативно модифіковані варіанти (наприклад, заміни дегенеративного кодону) і додаткові послідовності, а також явно вказану послідовність. Конкретно, заміну дегенеративного кодону можна виконати, генеруючи послідовності, в яких третє положення одного або декількох вибраних (або всіх) кодонів є заміщеним змішаними основними і/або дезоксиінозинними залишками [Batzer та інш., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka та інш., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini та інш. *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)]. Термін "нуклеїнова кислота" використовують взаємозамінно з термінами ген, кДНК, мРНК, олігонуклеотид і поліонуклеотид.

Символ, що використовується для позначення зв'язку або розташування перпендикулярно до зв'язку, вказує точку, в якій фрагмент, що відображається, приєднаний до залишку молекули, твердої підкладки та інш.

Якщо не указано по-іншому, термін "алкіл", сам по собі або як частина іншого замісника, означає лінійний або розгалужений ланцюг, або циклічний вуглеводний радикал, або їх комбінацію, які можуть бути повністю насиченими, моно- або поліненасиченими і можуть включати ди- і полівалентні радикали, що мають позначену кількість атомів вуглецю (а саме, C_1 - C_{10} означає від одного до десяти атомів вуглецю). Приклади насичених вуглеводних радикалів включають, але не обмежені цим, такі групи як метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, трет-бутил, ізобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропілметил, гомологи та ізомери, наприклад, н-пентилу, н-гексилу, н-гептилу, н-октилу і подібні. Ненасичена алкільна група являє собою групу, що має одну або більше подвійних зв'язків або потрійних зв'язків. Приклади ненасичених алкільних груп включають, але не обмежені цим, вініл, 2-пропеніл, кротил, 2-ізопентиніл, 2-(бутадієніл), 2,4-пентадієніл, 3-(1,4-пентадієніл), етиніл, 1- і 3-пропініл, 3-бутиніл і вищі гомологи та ізомери. Поки не відмічено по-іншому, мається на увазі, що термін "алкіл" також включає похідні алкілу, визначені детальніше нижче, наприклад, "гетероалкіл." Алкільні групи, які обмежені вуглеводними групами, позначаються як "гомоалкіл".

Термін "алкілен", сам по собі або як частина іншого замісника, означає бівалентний радикал, похідний алкану, прикладом якого є (але не обмежений цим) $CH_2CH_2CH_2CH_2-$, і, крім того, включає групи, описані нижче як "гетероалкілен". Звичайно

алкільна (або алкіленова) група має від 1 до 24 атомів вуглецю, при тому, що в даному винаході переважні групи, що мають 10 або менше атомів вуглецю. Вираз "нижчий алкіл" або "нижчий алкілен" означають алкільну або алкіленову групу з більш коротким ланцюгом, що звичайно має вісім або менше атомів вуглецю.

Якщо не указано по-іншому, термін "гетероалкіл", сам по собі або в комбінації з іншим терміном, означає стабільний лінійний або розгалужений ланцюг, або циклічний вуглеводний радикал, або їх комбінації, що включає вказану кількість атомів вуглецю і щонайменше один гетероатом, вибраний з групи, яка включає O, N, Si і S, де азот, вуглець і сірка можуть необов'язково знаходитись в окисленому стані, і гетероатом азоту може необов'язково бути кватернізований. Гетероатом(и) O, N, S і Si можуть розміщуватись в будь-якому внутрішньому положенні гетероалкільної групи або в положенні, по якому алкільна група приєднана до залишку молекули. Приклади включають, але не обмежені цим, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ і $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. До двох гетероатомів можуть розташовуватись послідовно, наприклад, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ і $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Аналогічно, термін "гетероалкілен", сам по собі або як частина іншого замісника, означає бівалентний радикал, похідний гетероалкілу, як, наприклад (але не обмежено цим), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ і $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Для гетероалкіленової групи гетероатоми можуть також займати будь-який з кінців або обидва кінці ланцюга (наприклад, алкіленокси, алкілендіокси, алкіленаміно, алкілендіаміно і подібні). Терміни "гетероалкіл" і "гетероалкілен" охоплюють полі(етиленгліколі) і його похідні [дивись, наприклад, Shearwater Polymers Catalog, 2001]. Крім того, для алкіленових і гетероалкіленових зв'язувальних груп, не мається на увазі орієнтація зв'язувальної групи в тому напрямі, в якому нарисована формула зв'язувальної групи. Наприклад, формула $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ являє собою обидва положення, $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ і $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$.

Термін "нижчий" в комбінації з термінами "алкіл" або "гетероалкіл" відноситься до фрагмента, що має від 1 до 6 атомів вуглецю.

Терміни "алкокси", "алкіламіно", "алкілсульфоніл" і "алкілтіо" (або тіоалкокси) використовуються в їх звичайному значенні і означають алкільні групи, приєднані до залишку молекули через атом кисню, аміногрупу, групу SO_2 або атом сірки, відповідно. Термін "арилсульфоніл" відноситься до арильної групи, приєднаної до залишку молекули через групу SO_2 , і термін "сульфідрил" відноситься до групи SH.

Взагалі, "ацильний замісник" також вибраний з групи, визначеної вище. Термін "ацильний замісник", що використовується тут, відноситься до груп, приєднаних і заповнюючих валентність карбонільного вуглецю, який безпосередньо або безпосередньо приєднаний до поліциклічних ядер сполук даного винаходу.

Якщо не указано по-іншому, терміни "циклоалкіл" і "гетероциклоалкіл", самі по собі або в комбінації з іншими термінами, означають циклічні варіанти заміщеного або незаміщеного "алкілу" і заміщеного або незаміщеного "гетероалкілу", відповідно. Крім того, для гетероциклоалкілу гетероатом може займати положення, по якому гетероцикл приєднаний до залишку молекули. Приклади циклоалкілів включають, але не обмежені цим, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексеніл, 3-циклогексеніл, циклогептил і подібні. Приклади гетероциклоалкілів включають, але не обмежені цим, 1-(1,2,5,6-тетрагідропіридил), 1-піперидиніл, 2-піперидиніл, 3-піперидиніл, 4-морфолініл, 3-морфолініл, тетрагідрофуран-2-іл, тетрагідрофуран-3-іл, тетрагідротієн-2-іл, тетрагідротієн-3-іл, 1-піперазиніл, 2-піперазиніл і подібні. Гетероатоми і атоми вуглецю циклічних структур необов'язково є окисленими.

Терміни "гало" або "галоген" самі по собі або як частина іншого замісника, означають, якщо не указано по-іншому, атом фтору, хлору, броду або йоду. Крім того, мається на увазі, що такі терміни як "галогеналкіл" включають моногалогеналкіл і полігалогеналкіл. Наприклад, мається на увазі, що термін "галоген(C_1-C_4)алкіл" включає, але не обмежений цим, трифторметил, 2,2,2-трифторетил, 4-хлорбутил, 3-бромпропіл і подібні.

Якщо не указано по-іншому, термін "арил" означає заміщений або незаміщений поліненасичений ароматичний вуглеводний замісник, який може являти собою один цикл або декілька циклів (переважно від 1 до 3 циклів), які сконденсовані разом або пов'язані ковалентно. Термін "гетероарил" відноситься до арильних груп (або циклів), які містять від одного до чотирьох гетероатомів, вибраних з N, O і S, де атоми азоту, вуглецю і сірки необов'язково є окисленими, і атом(и) азоту необов'язково кватернізований. Гетероарильна група може бути приєднана до залишку молекули через гетероатом. Необмежувальні приклади арильних і гетероарильних груп включають феніл, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-біфеніл, 1-піроліл, 2-піроліл, 3-піроліл, 3-піразоліл, 2-імідазоліл, 4-імідазоліл, піразиніл, 2-оксазоліл, 4-оксазоліл, 2-феніл-4-оксазоліл, 5-оксазоліл, 3-ізоксазоліл, 4-ізоксазоліл, 5-ізоксазоліл, 2-тіазоліл, 4-тіазоліл, 5-тіазоліл, 2-фурил, 3-фурил, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, 2-піримідил, 4-піримідил, 5-бензотіазоліл, пуриніл, 2-бензімідазоліл, 5-індоліл, 1-ізохіноліл, 5-ізохіноліл, 2-гуїноксалініл, 5-гуїноксалініл, 3-хіноліл і 6-хіноліл. Замісники для кожної з вказаних вище арильних і гетероарильних циклічних систем вибрані з групи прийнятих замісників, описаних нижче. "Арил" і "гетероарил" також охоплюють циклічні системи, в яких одна або більше неароматичних циклічних систем сконденсовані або пов'язані іншим чином, утворюючи арильну або гетероарильну систему.

Скорочено термін "арил", що використовується в комбінації з іншими термінами (наприклад, арилокси, арилтіокси, ариалкіл), включає і арильні, і гетероарильні цикли, які визначені вище. Таким чином, передбачається, що термін "арилалкіл" включає радикали, в яких арильна група приєдна-

на до алкільної групи (наприклад, бензил, фенетил, піридилметил і подібні), включаючи ті алкільні групи, в яких атом вуглецю (наприклад, метиленова група) замінений, наприклад, на атом кисню (наприклад, феноксиметил, 2-піридил оксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропіл і подібні).

Кожний з наведених вище термінів (наприклад, "алкіл", "гетероалкіл", "арил" і "гетероарил") включає заміщені і незаміщені форми вказаного радикалу. Переважні замісники для кожного типу радикалу наведені нижче.

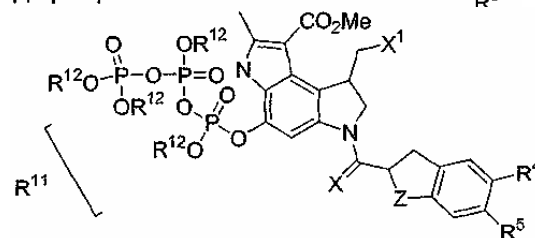
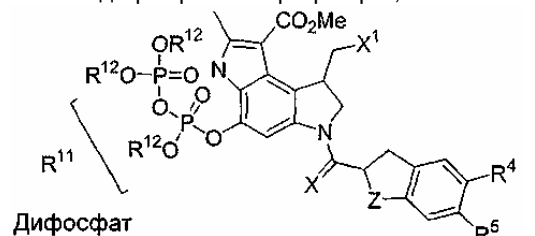
Замісники для алкільних і гетероалкільних радикалів (включаючи групи, що часто позначаються як алкілен, алкеніл, гетероалкілен, гетероалкеніл, алкініл, циклоалкіл, гетероциклоалкіл, циклоалкеніл і гетероциклоалкеніл) звичайно означають як "замісники для алкілу" і "замісники для гетероалкілу", відповідно, і вони можуть являти собою один або більше з множини груп, вибраних з (але не обмежених цим): $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR''$, $-SR'$, галогену, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ і $-NO_2$ в ряду від нуля до $(2m'+1)$, де m' дорівнює загальній кількості атомів вуглецю в такому радикалі. R' , R'' , R''' і R'''' , кожний переважно незалежно означає водень, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, наприклад, арил, заміщений 1-3 галогенами, заміщений або незаміщений алкіл, алкокси- або тіоалкоксигрупи або ариалкільні групи. Наприклад, якщо сполука винаходу включає більше однієї групи R , кожна з груп R незалежно вибрана як кожна група R' , R'' , R''' і R'''' , якщо присутня більше однієї з цих груп. Якщо R' і R'' приєднані до одного атома азоту, вони можуть бути об'єднані з даним атомом азоту, утворюючи 5-, 6- або 7-членний цикл. Наприклад, мається на увазі, що $-NR'R''$ включає, але не обмежений цим, 1-піролідиніл і 4-морфолініл. З наведеного вище обговорення замісників фахівцеві в даній галузі зрозуміло, що термін "алкіл", як мається на увазі, включає групи, що містять зв'язок атомів вуглецю з групами, які відрізняються від атомів водню, такі як галогеналкіл (наприклад, $-CF_3$ і $-CH_2CF_3$) і ацил (наприклад, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ і подібні).

Аналогічно замісникам, описаним для алкільного радикалу, замісники для арилу і замісники для гетероарилу звичайно позначають як "замісники для арилу" і "замісники для гетероарилу", відповідно, і варіюють і вибирають, наприклад, з: галогену, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR''$, $-SR'$, галогену, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ і $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, фтор(C_1-C_4)алкокси і фтор(C_1-C_4)алкілу в ряду від нуля до загальної кількості вільних валентностей ароматичної циклічної системи; де R' , R'' , R''' і R'''' , кожний переважно незалежно вибраний з атома водню, (C_1-C_8)алкілу і гетероалкілу, незаміщеного арилу і гетероарилу, (незаміщений арил)-(C_1-C_4)алкілу і (незаміщений

арил)окси-(C_1-C_4)алкілу. Наприклад, якщо сполука винаходу включає більше однієї групи R , то кожна з груп R незалежно вибрана як кожна група R' , R'' , R''' і R'''' , якщо присутня більше однієї з цих груп.

Два із замісників для арилу при сусідніх атомах арильного або гетероарильного циклу необов'язково можуть бути замінені замісником формули $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, де T і U незалежно являють собою $NR-$, $-O-$, $-CRR'$ - або простий зв'язок, і q дорівнює цілому числу від 0 до 3. По-іншому, два із замісників при сусідніх атомах арильного або гетероарильного циклу необов'язково можуть бути замінені замісником формули $-A(CH_2)_r-B-$, де A і B незалежно являють собою $-CRR'$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'$ або простий зв'язок, і r дорівнює цілому числу від 1 до 4. Один з простих зв'язків утвореного таким чином нового циклу необов'язково може бути замінені подвійним зв'язком. По-іншому, два із замісників для арилу при сусідніх атомах арильного або гетероарильного циклу необов'язково можуть бути замінені на замісник формули $-(CRR')_s-X-(CR'R'')_d-$, де s і d незалежно дорівнюють цілим числам від 0 до 3, і X означає $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ або $-S(O)_2NR'-$. Замісники R , R' , R'' і R''' переважно незалежно вибрані з водню або заміщеного або незаміщеного (C_1-C_6) алкілу.

Термін "дифосфат", що використовується тут, включає, але не обмежений цим, ефір фосфорної кислоти, що містить дві фосфатні групи. Термін "трифосфат" включає, але не обмежений цим, ефір фосфорної кислоти, що містить три фосфатні групи. Наприклад, конкретні лікарські засоби, що містять дифосфат або трифосфат, включають:



Термін "гетероатом", що використовується тут, включає атом кисню (O), азоту (N), сірки (S) і кремнію (Si).

Символ "R" є загальним позначенням, яке являє собою заміщувальну групу, яка вибрана із заміщених або незаміщених алкільних, заміщених або незаміщених гетероалкільних, заміщених або незаміщених арильних, заміщених або незаміщених гетероарильних і заміщених або незаміщених гетероцикільних груп.

Термін "фармацевтично прийнятний носій", що використовується тут, означає фармацевтично прийнятну речовину, композицію або носій, напри-

клад рідкий або твердий заповнювач, розріджувач, наповнювач, розчинник або інкапсулюючий матеріал, включений в хімічний носій або транспортувальний хімічний агент. Фармацевтично прийнятні носії включають фармацевтично прийнятні солі, де вираз "фармацевтично прийнятні солі" включає солі активних сполук, які одержують з відносно нетоксичних кислот або основ, в залежності від конкретних замінників в описаних тут сполуках. Якщо сполуки даного винаходу містять відносно кислотну функціональність, адитивні солі основ можна одержати взаємодією нейтральної форми таких сполук з достатньою кількістю необхідної основи, чистої або у відповідному інертному розчиннику. Приклади фармацевтично прийнятних адитивних солей основ включають солі натрію, кальцію, амонію, органічного аміну або магнію або аналогічні солі. Якщо сполуки даного винаходу містять відносно основну функціональність, то можна одержати адитивні солі кислот за допомогою взаємодії нейтральної форми такої сполуки з достатньою кількістю необхідної кислоти, чистої або у відповідному інертному розчиннику. Приклади фармацевтично прийнятних адитивних солей кислот включають солі, похідні таких неорганічних кислот, як соляні, бромистоводнева, азотна, вугільна, моногідровугільна, фосфорна, моногідрофосфорна, дигідрофосфорна, сірчана, моногідроірчана, йодистоводнева або фосфориста кислота і подібні, а також солі, похідні відносно нетоксичних органічних кислот, таких як оцтова, пропіонова, ізомасляна, малеїнова, малінова, бензойна, янтарна, пробкова, фумарова, молочна, мигдалева, фталева, бензолсульфонова, паратолісульфонова, лимонна, винна, метансульфонова і подібні. Також включені такі солі амінокислот, як аргінат і подібні, і солі таких органічних кислот, як глюкуронова або галактуринової кислоти і подібні [дивись, наприклад, Berge та інш., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19]. Деякі специфічні сполуки даного винаходу містять і основні, і кислотні функціональності, що дозволяє перетворювати дані сполуки в адитивні солі основ або кислот.

При взаємодії солі з основою або кислотою переважно відновлюється нейтральна форма сполуки і виділяється вихідна сполука звичайним чином. Вихідна форма сполуки відрізняється від різних сольових форм певними фізичними властивостями, наприклад, розчинністю в полярних розчинниках, в інших відношеннях солі еквівалентні вихідній формі сполуки для цілей даного винаходу.

Крім сольових форм даний винахід стосується сполук, які являють собою пролікарські форми. Описані тут пролікарські сполуки являють собою сполуки, які легко зазнають хімічних змін в фізіологічних умовах, забезпечуючи сполуки даного винаходу. Крім того, проліки можна перевести в сполуки даного винаходу хімічними або біохімічними способами *in vivo* середовищі. Наприклад, проліки можуть повільно перетворюватись в сполуки даного винаходу, якщо вмістити їх з відповідним ферментом або хімічним реагентом в резервуар пластиру для трансдермального застосування.

Деякі сполуки даного винаходу можуть існувати в несольватованих формах, а також сольватованих формах, включаючи гідратовані форми. Взагалі, сольватовані форми еквівалентні несольватованим формам і входять в галузь даного винаходу. Деякі сполуки даного винаходу можуть існувати в багатьох кристалічних або аморфних формах. Взагалі, всі фізичні форми еквівалентні для застосувань, передбачених даним винаходом, і передбачається, що вони включені в галузь даного винаходу.

Деякі сполуки даного винаходу мають асиметричні атоми вуглецю (оптично активні центри) або подвійні зв'язки; рацемати, діастереомери, геометричні ізомери та індивідуальні ізомери включені в галузь даного винаходу.

Сполуки даного винаходу можуть також містити штучні співвідношення атомних ізоотопів одного або декількох атомів, які складають такі сполуки. Наприклад, сполуки можуть бути міченими радіоактивними ізотопами, наприклад, тритієм (^3H), йодом-125 (^{125}I) або вуглецем-14 (^{14}C). Передбачається, що всі ізотопні варіанти сполук даного винаходу, радіоактивні або нерадіоактивні, включені в галузь даного винаходу.

Вираз "фрагмент, що "приєднується або "фрагмент для приєднання направляючої групи" відноситься до фрагмента, який дозволяє приєднання направляючої групи до лінкера. Групи, що звичайно приєднуються, включають (для прикладу, а не для обмеження) алкіл, аміноалкіл, амінокарбоніалкіл, карбоксилалкіл, гідроксилалкіл, алкіл-малеїмід, алкіл-N-гідроксилсукцинімід, полі(етилєнглїколь)-малеїмід і полі(етилєнглїколь)-N-гідроксилсукцинімід, кожний з яких може бути додатково заміщеним. Лінкер може також мати фрагмент, що приєднується, фактично підвішений до направляючої групи.

Термін "відхідна група", що використовується тут, відноситься до частини субстрату, яка відщеплюється від субстрату при взаємодії.

Термін "антитіло", що використовується тут, включає антитіла загалом і будь-який антигензв'язувальний фрагмент (тобто, "антигензв'язувальну частину") або його окремі ділянки. Термін "антитіло" відноситься до глікопротеїну, що включає щонайменше два важкі (H) ланцюги і два легкі (L) ланцюги, взаємопов'язані дисульфідними зв'язками, або до його антигензв'язувальної частини. Кожний важкий ланцюг складається з ділянки важкого ланцюга (V_H), що змінюється, і постійної ділянки важкого ланцюга. Постійна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів C_{H1} , C_{H2} і C_{H3} і може являти собою мю, дельта, гамма, альфа або епсилон-ізотип. Кожний легкий ланцюг складається з ділянки легкого ланцюга (V_L), що змінюється, і постійної ділянки легкого ланцюга. Постійна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену C_L , який може являти собою каппа- або лямбда-фзотип. Ділянки V_H і V_L можуть бути додатково поділені на ділянки гіперваріабельності, названі ділянками, що визначають комплементарність, (CDR), розкидані серед ділянок, які є більш консервативними, названих каркасними ділянками (FR). Кожна V_H і V_L складається з трьох CDR і чотирьох

FR, розставлених таким чином від аміно-кінця до карбокси-кінця: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ділянки важких і легких ланцюгів, що змінюються, містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Постійні ділянки антитіл можуть опосередковувати зв'язування імунoglobуліну з тканинами або факторами носія, включаючи різноманітні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи компліменту.

Вирази "фрагмент антитіла" або "антигензв'язувальна частина" антитіла (або просто "частина антитіла"), що використовуються тут, відносяться до одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватись з антигеном. Показано, що антигензв'язувальна функція антитіла може виконуватись фрагментами у всю довжину антитіла. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплені виразом "фрагмент антитіла" або "антигензв'язувальна частина" антитіла, включають (i) фрагмент Fab, одновалентний фрагмент, що складається з доменів V_L , V_H і C_L і C_{H1} (ii) фрагмент $F(ab)_2$, бівалентний фрагмент, що включає два фрагменти Fab, пов'язані дисульфідним міс точком в ділянці петлі; (iii) фрагмент Fd, що складається з доменів V_H і C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, що складається з доменів V_L і V_H однієї групи антитіла, (v) фрагмент dAb [Ward та інш., (1989) *Nature* 341: 544-546], який складається з домену V_H ; і (vi) виділена ділянка, що визначає комплементарність (CDR). Крім того, хоча два домени V_L і V_H фрагмента Fv кодовані окремими генами, їх можна об'єднати, використовуючи рекомбінантні способи, синтетичним лінкером, який дає можливість одержати їх у вигляді єдиного білкового ланцюга, в якому ділянки V_L і V_H утворюють пару, даючи одновалентну молекулу (відому як одноланцюговий Fv (scFv); дивись наприклад, [Bird та інш. (1988) *Science* 242: 423-426; і Huston та інш. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883]. Передбачається також, що такі одноланцюгові антитіла охоплені виразом "антигензв'язувальна частина" антитіла. Дані фрагменти антитіла одержують, застосовуючи звичайні методи, відомі фахівцям в даній галузі, і дані фрагменти відбирають за придатністю аналогічно цілим антитілам.

Вираз "моноклональне антитіло", що використовується тут, відноситься до одержання молекул антитіл єдиного молекулярного складу. Склад моноклонального антитіла демонструє єдину специфічність зв'язування і спорідненість до конкретного епітопу.

Для одержання моноклонального або поліклонального антитіла можна використати будь-яку методику, відому в даній галузі [дивись, наприклад, роботи Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor та інш., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole та інш., pp.77-96 в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)].

Способи одержання поліклональних антитіл відомі фахівцям в даній галузі. Інбредний штам мишей (наприклад, мишей BALB/C) або кроликів імунізують білком, використовуючи стандартний ад'ювант, наприклад, ад'ювант Фроїнда, і стандар-

тний протокол імунізації. Імунну реакцію тварин на імунотенний препарат контролюють, відбираючи зразки крові і визначаючи титр реактивності відносно бета-підодиноць. Якщо одержують прийнятно високі титри антитіла відносно імунотену, збирають кров тварини і готують антисироватки. Крім того, якщо потрібно, можна виконати фракціонування антисироваток для збагачення антитілами, реакційноздатними відносно білка.

Моноклональні антитіла можна одержати різними методиками, відомими фахівцям в даній галузі. Клітини селезінки тварини, імунізованої необхідним антигеном, іморталізують звичайно шляхом злиття з клітиною мієломи [дивись роботу Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976)]. Альтернативні способи іморталізації включають трансформіацію за допомогою вірусу Epstein Barr Virus, онкогенів або ретровірусів, або іншими способами, добре відомими в даній галузі. У переважному варіанті антитіло являє собою химерне або олюдене антитіло. Химерні або олюдені антитіла даного винаходу можна одержати, основувшись на послідовності щурячого моноклонального антитіла. ДНК, що кодує імунoglobуліни з важким і легким ланцюгом, можна одержати з щурячої гібридоми, що розглядається, і сконструювати таким чином, щоб вона містила не щурячі (наприклад, людські) імунoglobулінові послідовності, застосовуючи стандартні методи молекулярної біології. Наприклад, для створення химерного антитіла, щурячі ділянки, що змінюються, можна зв'язати з людськими постійними ділянками, застосовуючи способи, відомі в даній галузі [дивись, наприклад, патент США №4816567 (Cabilly та інш.)]. Для створення олюдненого антитіла, щурячі ділянки CDR можна вставити в людський каркас, застосовуючи способи, відомі в даній галузі [дивись, наприклад, патент США №5225539 (Winter), і патенти США №№5530101; 5585089; 5693762 і 6180370 (Queen та інш.)].

В іншому переважному варіанті антитіло є людським антитілом. Такі людські антитіла можна одержати за допомогою імунізації трансгенних або трансхромосомних мишей, в яких ендogenousні миша-чі імунoglobулінові гени інактивовані і введені екзогенні людські імунoglobулінові гени. Такі миші відомі в даній галузі [дивись, наприклад, патенти США №№5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 і 5770429 (всі Lonberg і Kay); патенти США №№5939598; 6075181; 6114598; 6150584 і 6162963 (Kucherlapati та інш.); і PCT-публікація WO 02/43478 (Ishida та інш.)]. Людські антитіла можна також одержати, використовуючи способи виділення фагів для скринінгу бібліотек людських імунoglobулінових генів. Такі способи виділення фагів для виділення людських антитіл також відомі в даній галузі [дивись, наприклад, патенти США №№5223409; 5403484 і 5571698 (Ladner та інш.); патенти США №№5427908 і 5580717 (Dower та інш.); патенти США №№5969108 і 6172197 (McCafferty та інш.); і патенти США №№5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 і 6593081 (Griffiths та інш.)].

Вираз "твердий носій", що використовується тут, відноситься до речовини, яка є по суті нерозчинною у вибраній системі розчинників або яку можна легко відділити (наприклад, осадженням) від вибраної системи розчинників, в якій він розчинений. Тверді носії, придатні для застосування на практиці даного винаходу, можуть включати групи, які активуються або здатні активуватись, дозволяючи вибраним типам утворювати зв'язки з твердим носієм. Твердий носій може також являти собою субстрат, наприклад, чіп, підкладку або осередок, з яким пов'язана індивідуальна сполука або більше однієї сполуки.

Вираз "реакційноздатні функціональні групи", що використовується тут, відноситься до груп, що включають (але не обмеженим цим) олефіни, ацетилени, спирти, феноли, прості ефіри, оксиди, галогеніди, альдегіди, кетони, карбонові кислоти, складні ефіри, амідни, ціанати, ізоціанати, тіоціанати, ізотіоціанати, аміни, гідразини, гідразони, гідразиди, діазо, діазоній, нітро, нітрили, меркаптани, сульфідни, дисульфідни, сульфоксиди, сульфони, сульфонові кислоти, сульфіннові кислоти, ацеталі, кеталі, ангідриди, сульфати, ізонітрили сульфенових кислот, амідини, іміди, імідати, нітрони, гідроксиаміни, оксими, гідроксамові кислоти, тіогідроксамові кислоти, алени, орто-складні ефіри, сульфіти, енаміни, інаміни, карбамідни, псевдокарбамідни, семікарбазиди, карбодііміди, карбамати, іміни, азиди, азо-сполуки, азокси-сполуки і нітрозосполуки. Реакційноздатні функціональні групи також включають групи, що використовуються для одержання біокон'югатів, наприклад, N-гідроксисукцинімідних складних ефірів, малеїмідів і подібних [дивись, наприклад, роботу Hemanson, Bioconjugat Methods, Academic press, San Diego, 1996]. Способи одержання кожної з даних функціональних груп добре відомі в даній галузі, і їх застосування або модифікація для конкретної мети входять в галузь можливостей фахівця в даній галузі [дивись, наприклад, роботу Sandier і Karo, eds., Organic Funktional Group Preparations, Academic Press, San Diego, 1989]. Реакційноздатні функціональні групи можуть бути захищеними або незахищеними.

Сполуки винаходу одержують у вигляді окремого ізомеру (наприклад, енантіомеру, цис-транс, позиційного, діастереомеру) або у вигляді суміші ізомерів. У переважному варіанті сполуки одержують по суті у вигляді окремого ізомеру. Способи одержання по суті ізомерно-чистих сполук відомі в даній галузі. Наприклад, енантіомерно-збагачені суміші і чисті енантіомерні сполуки можна одержати, використовуючи синтетичні проміжні продукти, які є енантіомерно-чистими, в комбінації з реакціями, які або залишають незмінною стереохімію в хіральному центрі, або дають її повну інверсію. По-іншому, поряд зі способом синтезу, кінцевий продукт або проміжні продукти можна розділити на окремі стереоізомери. Методи інверсії або збереження незмінного конкретного стереоцентру і методи розділення сумішей стереоізомерів добре відомі в даній галузі, і фахівець в даній галузі має досить можливостей вибрати і визначити спосіб для конкретної ситуації. У широкому значенні,

[дивись роботу Furniss та інш. (eds.), Vogel's Encyclopedia of Practical Organic Chemistry 5th Ed., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp. 809-816; і Heller, Ace. Chem. Res. 23: 128 (1990)].

Лінкери

Даний винахід стосується кон'югатів ліки-ліганд, де ліки пов'язані з лігандом через хімічний лінкер. Даний лінкер являє собою пептидний, гідразинний або дисульфідний лінкер і зображений тут як $(L^4)_p-F-(L^1)_m$, $(L^4)_p-H-(L^1)_m$ або $(L^4)_p-J-(L^1)_m$, відповідно. В доповнення до лінкерів, які, приєднані до ліків, даний винахід також стосується відщеплюваних лінкерних груп, які підходять для приєднання по суті до будь-яких молекулярних типів. Аспект винаходу, що стосується лінкерних груп, проілюстрований тут згадкою їх приєднання до терапевтичного фрагмента. Однак фахівцеві в даній галузі ясно, що лінкери можуть бути приєднані до різних типів, виключаючи, але не обмежуючись цим, діагностичні агенти, аналітичні агенти, біомолекули, направляючі агенти, мітки, що детектуються, і подібне.

Один аспект даного винаходу стосується лінкерів, які придатні для приєднання направляючих груп до терапевтичних агентів і маркерів. Інший аспект винаходу стосується лінкерів, які додають сполукам стабільність, знижують їх *in vivo* токсичність або, по-іншому, сприятливим чином впливають на їх фармакокінетику, біологічну доступність і/або фармакодинаміку. Звичайно переважно, щоб в таких варіантах лінкер відщеплювався, вивільняючи активні ліки, як тільки ліки доставлені до місця їх дії. Таким чином, в одному варіанті винаходу лінкери даного винаходу є безслідними, так що при видаленні лінкерів від терапевтичного агента або маркера (як при активації) не залишається слідів його присутності.

В іншому варіанті винаходу лінкери характеризуються своєю здатністю відщеплюватись на місці або поруч з клітиною-мішенню, наприклад, на місці терапевтичної дії або активності маркера. Таке розкладання може бути ферментативним за природою. Дана особливість сприяє зниженню системної активації терапевтичного агента або маркера, знижуючи токсичність і системні побічні ефекти. Переважні для ферментативного розкладання групи, що розщеплюються, включають пептидні зв'язки, складноєфірні і дисульфідні зв'язки. В інших варіантах лінкери чутливі до pH і відщеплюються зміною pH.

Важливим аспектом даного винаходу є здатність регулювати швидкість, з якою відщеплюються лінкери. Наприклад, особливо придатні описані тут гідразинні лінкери, оскільки, в залежності від конкретної структури, що використовується, можна варіювати швидкість, з якою лінкер циклізується і при цьому відщеплює ліки від ліганду. [WO 02/096910] стосується деяких специфічних комплексів ліганд-ліки, що мають гідразинний лінкер. Однак не існує способу "приспособити" лінкерну композицію, залежну від необхідної швидкості циклізації, і конкретні описані сполуки відщеплюють ліганд від ліків з меншою швидкістю, ніж переважна швидкість для багатьох кон'югатів ліки-лінкер. У

протилежність цьому, гідразинові лінкери за даним винаходом забезпечують діапазон швидкостей циклізації від дуже швидкої до дуже повільної, допускаючи тим самим вибір конкретного гідразинового лінкера на основі необхідної швидкості циклізації. Наприклад, дуже швидко циклізацію можна здійснити з гідразиновими лінкерами, які дають при розкладанні один 5-членний цикл. Переважних швидкостей циклізації для цільової доставки цитотоксичного агента в клітини досягають, використовуючи гідразинові лінкери, які дають при розкладанні або два 5-членних цикли, або один 6-членний цикл, що виходить з лінкера, який має два метили в гемінальному положенні. Показано, що гемм-диметильний ефект збільшує швидкість реакції циклізації у порівнянні з одним 6-членним циклом за відсутності двох метилів в гемінальному положенні. Це відбувається внаслідок напруження, яке вивільняється в циклі. Однак іноді замісники можуть уповільнювати реакцію замість того, щоб прискорювати її. Часто причинами уповільнення можуть бути стеричні перешкоди. Як показано у прикладі 2.4, гемм-диметильне заміщення допускає значно більш швидке протікання реакції циклізації у порівнянні з випадком, коли гемінальний вуглець присутній у вигляді CH_2 .

Однак важливо зазначити, що в деяких варіантах лінкер, який відщеплюється повільніше, може бути переважним. Наприклад, в препараті з уповільненим вивільненням або в препараті з обома компонентами, для швидкого і повільного вивільнення, може бути корисно забезпечити лінкер, який відщеплюється повільніше. У деяких варіантах низької швидкості циклізації досягають, використовуючи гідразиновий лінкер, який продукує при розкладанні або один 6-членний цикл без гемм-диметильного заміщення, або один 7-членний цикл.

Лінкери також служать для стабілізації терапевтичного агента або маркера від розкладання в циркулюючій крові. Дана особливість забезпечує суттєву перевагу, оскільки така стабілізація дає в результаті продовження періоду напіврозпаду при циркуляції приєднаного агента або маркера. Лінкер також служить для ослаблення активності приєднаного агента або маркера, тому кон'югат є відносно м'яким при циркуляції і надає необхідний ефект, наприклад, є токсичним після активації в бажаному місці дії. Для кон'югатів терапевтичних агентів дана особливість лінкера служить для поліпшення терапевтичного індексу агента.

Стабілізуючі групи переважно вибирають з метою обмеження кліренса і метаболізму терапевтичного агента або маркера ферментами, які можуть бути присутніми в крові або нецільовій тканині і, крім того, вибирають з метою обмеження транспорту агента або маркера в клітини. Стабілізуючі групи служать для блокування розкладання агента або маркера і можуть також діяти, забезпечуючи інші фізичні характеристики агента або маркера. Стабілізуюча група може також поліпшувати стабільність агента або маркера при зберіганні у вигляді препарату або в нерецептованому вигляді.

В ідеальному випадку стабілізуюча група придатна для стабілізації терапевтичного агента або

маркера, якщо вона сприяє захисту агента або маркера від розкладання в дослідженні при зберіганні агента або маркера в крові людини при 37°C протягом 2 год. і дає менше 20%, переважно менше 10%, більш переважно менше 5% і ще більш переважно менше 2% розкладання агента або маркера ферментами, присутніми в крові людини в даних умовах дослідження.

Даний винахід також стосується кон'югатів, що містять даний лінкер. Більш конкретно, винахід стосується проліків, які можна використати для лікування захворювання, особливо для хіміотерапії раку. Більш точно, застосування описаних тут лінкерів забезпечує проліки, які демонструють високу специфічність дії, знижену токсичність і поліпшену стабільність в крові відносно проліків аналогічної структури.

Лінкери даного винаходу, які тут описані, можуть бути присутніми в будь-якому положенні всередині цитотоксичного кон'югату.

Таким чином, забезпечений лінкер, який може містити будь-яку з різноманітних груп як частину свого ланцюга, яка відщеплюється *in vivo*, наприклад, в потоку крові, зі швидкістю, яка збільшена у порівнянні з швидкістю для конструкцій, які не мають таких груп. Забезпечені також кон'югати лінкерних груп з терапевтичними і діагностичними агентами. Лінкери придатні для утворення аналогів проліків терапевтичних агентів і оборотного зв'язування терапевтичного або діагностичного агента з направляючим агентом, міткою, що детектується, або твердим носієм. Лінкери можуть бути включені в комплекси, які містять цитотоксини винаходу.

Крім відщеплюваної пептидної, гідразинової або дисульфідної групи між цитотоксином і направляючим агентом необов'язково вводять одну або більше саморуйнівних лінкерних груп L^1 . Ці лінкерні групи також можуть бути описані як спейсерні групи і містять щонайменше дві реакційноздатні функціональні групи. Звичайно одна хімічна функціональність спейсерної групи пов'язана з хімічною функціональністю терапевтичного агента, наприклад, цитотоксину, тоді як інша хімічна функціональність спейсерної групи використовується для зв'язку з хімічною функціональністю направляючого агента або відщеплюваного лінкера. Приклади спейсерних груп включають гідрокси, меркапто, карбоніл, карбокси, аміно, кетонів і меркаптогрупи.

Саморуйнівні лінкери, позначені як L^1 , звичайно являють собою заміщену або незаміщену алкільну, заміщену або незаміщену арильну, заміщену або незаміщену гетероарильну або заміщену або незаміщену гетероалкільну групу. В одному варіанті алкільні або арильні групи можуть містити від 1 до 20 атомів вуглецю. Вони можуть також містити поліетиленглікольний фрагмент.

Типові спейсерні групи включають, наприклад, 6-аміногексанол, 6-меркаптогексанол, 10-гідроксидеканову кислоту, гліцин та інші амінокислоти, 1,6-гександіол, валанін, 2-аміноетанол, цистеамін (2-аміноетантіол), 5-амінопентанову кислоту, 6-аміногексанову кислоту, 3-малеїмідобензойну кислоту, фталід, α -заміщені фталіди, карбонільну

групу, тваринні складні ефіри, нуклеїнові кислоти, пептиди і подібні.

Спейсер може служити для введення додаткової молекулярної маси і хімічної функціональності в комплекс цитотоксин-направляючий агент. Звичайно додаткова маса і функціональність впливають на період напіврозпаду в сироватці та інші властивості комплексу. Таким чином, шляхом ретельного вибору спейсерної групи можна одержати цитотоксинові комплекси з набором періодів напіврозпаду в сироватці.

Спейсер(и), розташований в безпосередньому сусідстві з лікарським фрагментом, означають також $(L^1)_m$, де m дорівнює цілому числу, вибраному з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6. Якщо присутні багато спейсерів L^1 , то можна використати однакові або різні спейсери. L^1 може являти собою будь-яку саморуйнівну групу.

В одному варіанті, L^1 переважно означає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл і заміщений гетероциклоалкіл. Якщо кон'югат ліки-ліганд містить гідразинний лінкер, L не містить дисульфідного зв'язку.

L^4 означає лінкерний фрагмент, який повідомляє підвищену розчинність або знижені агрегаційні властивості кон'югатам, що використовують лінкер, який містить даний фрагмент. Лінкер L^4 не повинен бути саморуйнівним. В одному варіанті фрагмент L^4 являє собою заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероалкіл або незаміщений гетероалкіл, будь-який з них може бути лінійним, розгалуженим або циклічним. Замісником може бути, наприклад, нижчий (C_1 - C_6) алкіл, алкокси, алкілтіо, алкіламіно або діалкіламіно. У деяких варіантах L^4 містить нециклічний фрагмент. В іншому варіанті L^4 містить будь-який позитивно або негативно заряджений такий амінокислотний полімер, як полілізин або поліаргінін. L^4 може містити такий полімер як поліетиленглікольний фрагмент. Крім того, лінкер L^4 містить, наприклад, і полімерний компонент, і невеликий хімічний фрагмент.

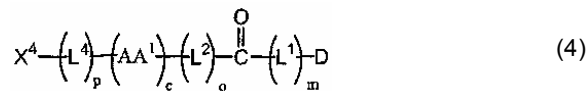
У переважному варіанті L^4 містить поліетиленглікольний (PEG) фрагмент. PEG-частина лінкера L^4 може знаходитись між 1 і 50 одиницями по довжині. Переважно, якщо PEG має 1-12 ланок, що повторюються, більш переважно 3-12 ланок, що повторюються, більш переважно 2-6 ланок, що повторюються, ще більш переважно 3-5 ланок, що повторюються, і найбільш переважно 4 ланки, що повторюються. L^4 може складатись виключно з PEG-фрагмента або може також містити додатковий заміщений або незаміщений алкіл або гетероалкіл. Корисно комбінувати PEG як частину фрагмента L^4 для підвищення розчинності комплексу у воді. Крім того, PEG-фрагмент знижує міру агрегації, яка може відбуватись під час кон'югації ліків і антитіла.

(1) Пептидні лінкери (F)

Як обговорюється вище, пептидні лінкери винаходу можна представити загальною формулою: $(L^4)_p$ -F- $(L^1)_m$, де F означає лінкерну частину, що включає пептидний фрагмент. В одному варіанті F-частина містить необов'язковий додатковий са-

моруйнівний лінкер(и) L і карбонільну групу. В інших варіантах F-частина містить аміногрупу і необов'язкову спейсерну групу (групи) L^2 .

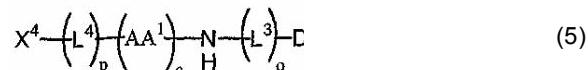
Таким чином, в одному варіанті кон'югат, що включає пептидний лінкер, містить структуру формули 4:



В даному варіанті L^1 означає саморуйнівний лінкер, який описаний вище, і L^4 означає фрагмент, який надає підвищену розчинність або знижені агрегаційні властивості, як описано вище. L^2 являє собою саморуйнівний лінкер(и). m дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6; o і p незалежно дорівнюють 0 або 1. В одному варіанті m дорівнює 3, 4, 5 або 6. AA^1 являє собою одну або більше природних амінокислот і/або штучних α -амінокислот; c дорівнює цілому числу від 1 до 20.

У пептидних лінкерах даного винаходу, що мають наведену вище формулу 4, AA^1 пов'язаний по своєму аміно-кінцю безпосередньо з L^4 або, якщо L^4 відсутній, безпосередньо з групою X (тобто, направляючим агентом, міткою, що детектується, захищеною реакційноздатною функціональною групою або незахищеною реакційноздатною функціональною групою). У деяких варіантах L^4 , якщо присутній, не містить карбоксильної ацильної групи, безпосередньо приєднаної до N-кінця $(AA^1)_c$. Таким чином, в даних варіантах не є необхідною наявність карбоксильної ацильної одиниці безпосередньо між L^4 або X^4 і AA^1 , як потрібно в пептидних лінкерах [патенту США №6214345].

В іншому варіанті кон'югат, що включає пептидний лінкер, містить структуру формули 5:



В даному варіанті L^4 означає фрагмент, який додає підвищену розчинність або знижені агрегаційні властивості, як описано вище; L^3 означає спейсерну групу, що включає первинний або вторинний амін або карбоксильну функціональну групу, і амін лінкера L^3 утворює амідний зв'язок з підвищеною карбоксильною функціональною групою від D або карбоксил лінкера L^3 утворює амідний зв'язок з підвищеною аміною функціональною групою від D; o і p незалежно дорівнюють 0 або 1. AA^1 являє собою одну або більше природних амінокислот і/або штучних α -амінокислот; c дорівнює цілому числу від 1 до 20. В даному варіанті L^1 відсутній (тобто, в загальній формулі m дорівнює 0).

У пептидних лінкерах за даним винаходом, що мають наведену вище формулу 5, AA^1 пов'язаний по своєму аміно-кінцю безпосередньо з L^4 або, якщо L^4 відсутній, безпосередньо з X^4 групою (тобто, направляючим агентом, міткою, що детектується, захищеною реакційноздатною функціональною групою або незахищеною реакційноздатною функціональною групою). У деяких варіантах L^4 , якщо присутній, не містить карбоксильної ацильної групи, безпосередньо приєднаної до N-кінця $(AA^1)_c$. Таким чином, в даних варіантах не є необхідною наявність карбоксильної ацильної одиниці безпо-

середньо між L^4 або X^4 і AA^1 , як потрібно в пептидних лінкерах [патенту США №6214345].

Саморуйнівний лінкер L^2

Саморуйнівний лінкер L^2 являє собою біфункціональний хімічний фрагмент, який здатний ковалентно зв'язувати разом два рознесених в просторі хімічних компоненти в нормально стабільну молекулу, що складається з трьох частин, вивільняючи один з вказаних рознесених в просторі хімічних компонентів з молекули, що складається з трьох частин, за допомогою ферментативного розкладання; і після вказаного ферментативного розкладання мимовільно відщеплюватись від частини молекули, що залишилась, вивільняючи інший з вказаних рознесених в просторі хімічних компонентів. Згідно з даним винаходом, саморуйнівний спейсер ковалентно пов'язаний по одному зі своїх кінців з пептидним фрагментом і ковалентно пов'язаний по іншому кінцю з хімічно реакційноздатним сайтом лікарського фрагмента, дериватизація якого інгібує фармакологічну активність, таким чином, щоб розділити в просторі і ковалентно зв'язати разом пептидний фрагмент і лікарський фрагмент в молекулу, що складається з трьох частин, яка стабільна і фармакологічно неактивна за відсутності цільового ферменту, але яка здатна ферментативно розщеплюватись таким цільовим ферментом по зв'язку, ковалентно з'єднуючому спейсерний фрагмент і пептидний фрагмент, здійснюючи тим самим вивільнення пептидного фрагмента з молекули, що складається з трьох частин. Таке ферментативне розкладання, в свою чергу, активує саморуйнівний характер спейсерного фрагмента та ініціює мимовільне розщеплення зв'язку, ковалентно з'єднуючого спейсерний фрагмент з лікарським фрагментом, здійснюючи тим самим вивільнення ліків у фармакологічно активному вигляді.

Саморуйнівний лінкер L^2 може являти собою будь-яку саморуйнівну групу. Переважно L^2 являє собою заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, заміщений гетероциклоалкіл, заміщений і незаміщений арил і заміщений і незаміщений гетероарил.

Один особливо переважний саморуйнівний спейсер L^2 можна представити формулою 6:

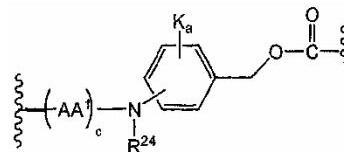


Ароматичне кільце амінобензильної групи може бути заміщене однією або декількома групами "K". Група "K" являє собою замісник в ароматичному кільці, який замінює атом водню, в іншому випадку приєднаний до одного з чотирьох незаміщених атомів вуглецю, які є частиною циклічної структури. Група "K" може являти собою окремий атом, наприклад, галоген, або багатоатомну групу, наприклад, алкіл, гетероалкіл, аміно, нітро, гідрокси, алкокси, галогеналкіл і ціано. Кожна група K незалежно вибрана з груп, що включають заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл;

міщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCOR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$ і OR^{21} , де R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з груп, що включають H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл і незаміщений гетероциклоалкіл. Типові замісники K включають, але не обмежені цим, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ і метил. Для групи "Ka", а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4. В одному переважному варіанті а дорівнює 0.

Ефірний атом кисню показаної вище структури з'єднаний з карбонільною групою. Лінія від NR^{24} -функціональності в ароматичний цикл вказує, що амінна функціональність може бути пов'язана з будь-яким з п'яти атомів вуглецю, які утворюють даний цикл і не заміщені групою $-CH_2O-$. Переважно, якщо NR^{24} -функціональність від X ковалентно пов'язана з ароматичним циклом по пароположенню відносно групи $-CH_2O-$. R^{24} означає компонент, вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл. У конкретному варіанті R^{24} означає водень.

У переважному варіанті винахід стосується пептидного лінкера формули (4), наведеної вище, де F має структуру:



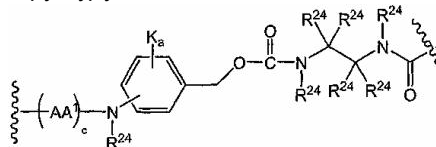
де R^{24} вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

кожний K означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCOR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$ і OR^{21} ,

де R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл;

а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4.

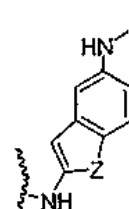
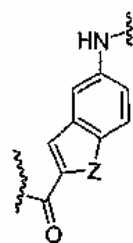
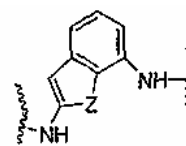
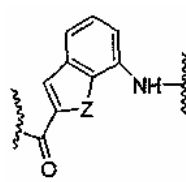
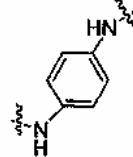
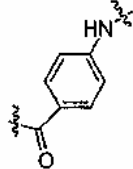
В іншому варіанті пептидний лінкер формули (4), наведеної вище, містить $-F-(L^1)_m$ який має структуру:



де кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл.

Спейсерна група L^3

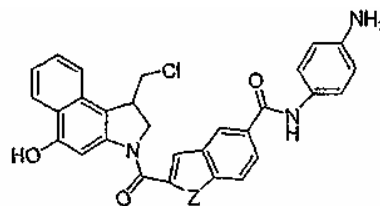
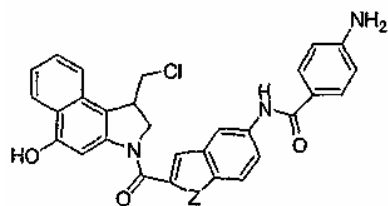
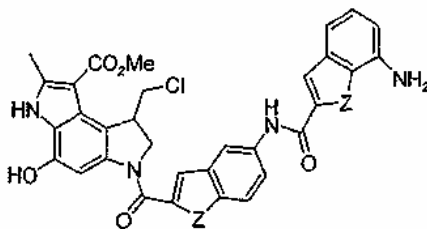
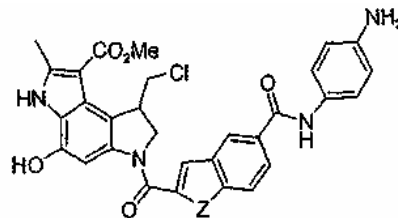
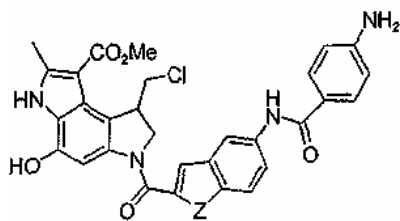
Спейсерна група L^3 характеризується тим, що містить первинну або вторинну аміно або карбоксильну функціональну групу, і амін групи L^3 утворює амідний зв'язок з підвешеною карбоксильною функціональною групою від D, або карбоксил від L^3 утворює амідний зв'язок з підвешеною аміною функціональною групою від D. L може бути вибраний з групи, яка включає заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений арил, заміщений або незаміщений гетероарил або заміщений або незаміщений гетероциклоалкіл. У переважному варіанті L^3 містить ароматичну групу. Більш переважно, якщо L^3 містить бензойну кислотну групу, анілінову групу або індольну групу. Необмежувальні приклади структур, які можуть служити як спейсер $-L^3-NH-$, включають наступні структури:

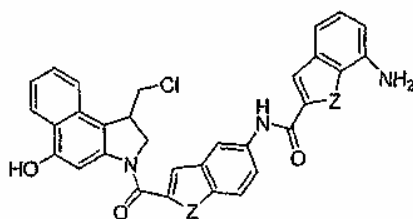


де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR^{25} , i

де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу.

Після відщеплення лінкера даного винаходу, що містить L^3 , фрагмент L^3 залишається приєднаним до ліків D. Тому фрагмент L^3 вибирають таким чином, щоб його присутність приєднанням до D суттєво не змінювало активності D. В іншому варіанті частина ліків D сама функціонує як спейсер L^3 . Наприклад, в одному варіанті ліки D являють собою похідне дуокарміцину, в якому частина ліків функціонує як спейсер L^3 . Необмежувальні приклади таких варіантів включають варіанти, в яких $NH_2(L^3)-D$ має структуру, вибрану з групи, яка включає:





де Z означає компонент, вибраний з O, S і NR²³,

де R²³ означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; і

де група NH₂ на кожній структурі взаємодіє з (AA¹)_c, утворюючи -(AA¹)_c-NH-

Пептидна послідовність AA¹

Група AA¹ являє собою окрему амінокислоту або множину амінокислот, які об'єднані разом амідними зв'язками. Амінокислоти можуть бути природними амінокислотами і/або штучними α-амінокислотами.

Пептидна послідовність (AA¹)_c функціонально являє собою залишок амідифікування окремої амінокислоти (якщо c=1) або множини амінокислот, об'єднаних разом амідними зв'язками. Пептид даного винаходу вибирають так, щоб направити розщеплення пептиду, яке каталізується ферментом, в необхідне місце біологічної системи. Наприклад, для кон'югатів, які прямують в клітину, використовуючи направляючий агент, і потім закріплюються клітиною, вибирають пептид таким чином, щоб він віщеплювався однією або декількома лізосомальними протеазами, таким чином, щоб відщеплення пептиду відбувалось внутрішньоклітинно в лізосомі. Кількість амінокислот в пептиді може складати від 1 до 20; але більш переважні (AA¹)_c, які включають 2-8 амінокислот, 2-6 амінокислот або 2, 3 або 4 амінокислоти. Пептидні послідовності, які чутливі до розщеплення специфічними ферментами або класами ферментів, добре відомі в даній галузі.

У даній галузі відомі багато які пептидні послідовності, які розщеплюються ферментами в сироватці, печінці, кишечнику та інш. Типова пептидна послідовність за даним винаходом включає пептидну послідовність, яка розщеплюється протеазою. Подальше обговорення сфокусоване на використанні протеаза-чутливої послідовності для ясності ілюстрації, а не для обмеження області даного винаходу.

Якщо фермент, який розщеплює пептид, є протеазою, то лінкер звичайно включає пептид, що містить розпізнавану послідовність для протеази. Послідовність розпізнавання розщеплення для протеази являє собою амінокислотну послідовність, розпізнавану протеазою при протеолітичному розкладанні. В даній галузі відомі багато які сайти протеазного розкладання, і ці та інші сайти розкладання можна включити в лінкерний фрагмент. Дивись, наприклад, роботи [Matayoshi та інш., Science 247: 954 (1990); Dunn та інш., Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah та інш., Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber та інш., Meth.

Enzymol. 244: 595 (1994); Smith та інш., Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); Bouvier та інш., Meth. Enzymol. 248: 614 (1995), Hardy та інш., в Amyloid Protein Precursor in Development, Aging and Alzheimer's Disease, ed. Masters та інш., pp.190-198 (1994)].

Амінокислоти пептидної послідовності (AA¹)_c вибирають на основі їх придатності для селективного ферментативного розкладання конкретними молекулами, наприклад, пов'язаної з пухлиною протеазою. Амінокислоти, що використовуються, можуть бути природними або неприродними амінокислотами. Вони можуть знаходитись в L або D конфігурації. В одному варіанті використовують щонайменше три різні амінокислоти. В іншому варіанті використовують тільки дві амінокислоти.

У переважному варіанті пептидну послідовність (AA¹)_c вибирають на основі її здатності розщеплюватись лізосомальними протеазами, необмежувальні приклади яких включають катепсини B, C, D, H, L і S. Переважно, якщо пептидна послідовність (AA¹)_c здатна розщеплюватись катепсином B in vitro, що можна перевірити, застосовуючи in vitro дослідження протеазного розкладання, відомі в даній галузі.

В іншому варіанті пептидну послідовність (AA¹)_c вибирають на основі її здатності розщеплюватись протеазою, пов'язаною з пухлиною, наприклад, протеазою, яка виявлена поза клітиною поблизу пухлинних клітин, необмежувальні приклади якої включають тимет-олігопептидазу (TOP) і CD 10. Здатність пептиду розщеплюватись за допомогою TOP або CD 10 можна перевірити, застосовуючи відомі в даній галузі in vitro дослідження протеазного розкладання.

Відповідні, але необмежувальні приклади пептидних послідовностей, відповідних для використання в кон'югатах за даним винаходом, включають Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нітро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 1), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 2) і Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 3). Переважними пептидними послідовностями є Val-Cit і Val-Lys.

В іншому варіанті амінокислота, розташована в найближчому положенні до лікарського фрагмента, вибрана з групи, яка включає: Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gin, Glu, Gly, He, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr і Val. Ще в одному варіанті амінокислота, розташована в найближчому положенні до лікарського фрагмента, вибрана з групи, яка включає: Ala, Asn, Asp, Cys, Gin, Glu, Gly, He, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tip, Tyr і Val.

Протеази причетні до ракових метастазів. Підвищений синтез протеази урокінази корелює з підвищеною здатністю утворення метастазів у багатьох ракових захворюваннях. Урокіназа активує плазмін з плазміногену, який розташований повсюдно у позаклітинному просторі, і його активація може спричиняти руйнування білків у позаклітинному матриксі, через який відбувається ураження метастазуючими пухлинними клітинами. Плазмін також може активувати колагенази, промотуючи, таким чином, руйнування колагену в основній мембрані, яка оточує капіляри, і лімфотичній системі, дозволяючи тим самим пухлинним клітинам вражати тканини-мішені [Dano, та інш., Adv. Pak. Res., 44: 139 (1985)]. Таким чином, в галузь даного винаходу входить застосування лінійної пептидної послідовності, яка розщеплюється урокіназою.

Винахід також стосується застосування пептидних послідовностей, які є чутливими до розщеплення триптазами. Тучні клітини людини експресують щонайменше чотири різних триптази, позначені α , $\beta 1$, $\beta 2$. Дані ферменти не регулюються інгібіторами протеїнази плазми крові і тільки розщеплюють деякі фізіологічні субстрати *in vitro*. Триптазне сімейство серинпротеаз причетне до різноманітних алергічних і запальних захворювань, що включають тучні клітини, через підвищені рівні триптази, виявлені в біологічних рідинах пацієнтів з даними порушеннями. Однак точна роль триптази в патофізіології захворювання вимагає з'ясування. Область біологічних функцій і відповідних фізіологічних наслідків дії триптаз визначається, головним чином, їх субстрат-специфічністю.

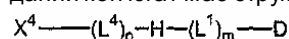
Триптаза являє собою сильнотоксичний активатор проурокиназного активатора плазміногену (uPA), зимогенної форми протеази, пов'язаної з метастазом і проростанням пухлин. Активація плазміногенного каскаду, результатом якої є деструкція позаклітинного матриксу внаслідок клітинної екстравазації і міграції, може бути функцією триптазної активації проурокиназного активатора плазміногену в послідовності P4-P1 Pro-Arg-Phe-Lys (SEQ ID NO: 4) [Stack та інш., Journal of Biological Chemistry 269 (13): 9416-9419 (1994)]. Вазоактивний кишковий пептид, нейропептид, який включений в регуляцію проникності судин, також відщеплюється триптазою, головним чином, по послідовності Thr-Arg-Leu-Arg (SEQ ID NO: 5) [Tarn та інш., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3: 27-32 (1990)]. Пов'язаний з G-білком рецептор PAR-2 можна відщепити і активувати триптазою по послідовності Ser-Lys-Gly-Arg (SEQ ID NO: 6) здійснюючи проліферацію фібробластів, тоді як тромбін-активовані рецептор PAR-1 дезактивується триптазою по послідовності Pro-Asn-Asp-Lys (SEQ ID NO: 7) [Molino та інш., Journal of Biologic Chemistry 272(7): 4043-4049 (1997)]. Взяті разом, дані факти передбачають центральну роль триптази в корекції тканини як наслідок захворювання. Це узгоджується з глибокими змінами, що спостерігаються в деяких порушеннях, опосередкованих тучними клітинами. Однією ознакою хронічної астми та інших тривалих респіраторних захворювань є фіброз і ущільнення схильних до впливу тканин, які

можуть бути результатом активації триптази фізіологічних мішеней. Аналогічно, ряд повідомлень показує, що ангиогенез пов'язаний з щільністю тучних клітин, активністю триптази і поганим прогнозом при різноманітні ракових захворювань [Coussens та інш., *Genes and Development* 13(11): 1382-97 (1999); Takanami та інш., *Cancer* 88(12): 2686-92 (2000); Toth-Jakatics та інш., *Human Pathology* 31(8): 955-960 (2000); Ribatti та інш., *International Journal of Cancer* 85(2): 171-5 (2000)].

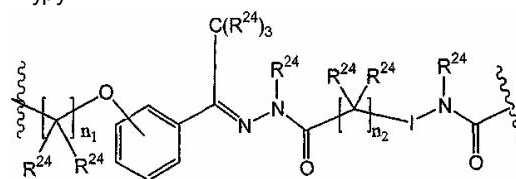
В даній галузі відомі способи для оцінки, чи розщеплює конкретна протеаза вибрану пептидну послідовність. Наприклад, використання 7-аміно-4-метилкумаринових (AMC) флуорогенних пептидних субстратів є добре відомим способом визначення специфічності протеази [Zimmelman, M., та інш., (1977) *Analytical Biochemistry* 78: 47-51]. Специфічне розщеплення анілідного зв'язку звільняє флуорогенну відхідну групу AMC, допускаючи просте визначення швидкостей розкладання для індивідуальних субстратів. Пізніше використали масиви [Lee, D., та інш., (1999) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 1667-72] і бібліотеки позиційного сканування [Rano, T.A., та інш., (1997) *Chemistry & Biology* 4: 149-55] бібліотек AMC-пептидних субстратів для швидкого профілювання N-термінальної специфічності протеаз, в одному експерименті відбираючи зразки субстратів в широкому діапазоні. Таким чином, фахівець в даній галузі може легко оцінити порядок пептидних послідовностей для визначення їх придатності в даному винаході, не вдаючись до надмірного експериментування.

(2) Гідразинові лінкери (H)

У другому варіанті кон'югат за даним винаходом містить гіدразиновий саморуйнівний лінкер, де даний кон'югат має структуру:



де D , L^1 , L^4 і X^4 такі, як визначено вище і описано тут далі, і H означає лінкер, що включає структуру:



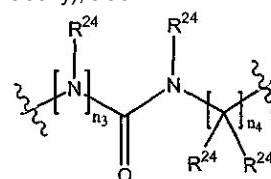
де

n_1 дорівнює цілому числу від 1 до 10;

n_2 дорівнює 0, 1 або 2;

кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл: і

І означає або зв'язок (а саме, зв'язок між атомом вуглецю основного ланцюга і сусіднім атомом азоту), або:

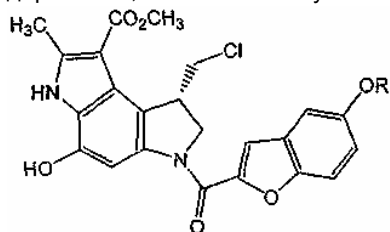


де n_3 дорівнює 0 або 1, за умови, що якщо n_3 дорівнює 0, то n_2 не дорівнює 0;

i

n_4 дорівнює 1, 2 або 3,

де, якщо I означає зв'язок, щ дорівнює 3 і n_2 дорівнює 1, то D не може бути



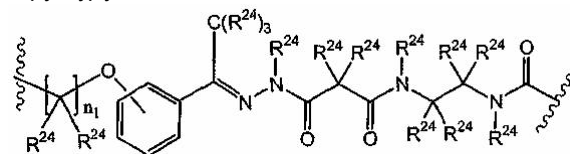
де R означає Me або $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NMe}_2$.

В одному варіанті заміщення по фенільному кільцю є пара-заміщенням. У переважних варіантах n_1 дорівнює 2, 3 або 4 або n_1 дорівнює 3. В переважних варіантах n_2 дорівнює 1. В переважних варіантах I означає зв'язок (а саме, зв'язок між атомом вуглецю основного ланцюга і сусіднім атомом азоту). В одному аспекті гідразинний лінкер H може утворювати при розкладанні 6-членний саморуйнівний лінкер, наприклад, якщо n_3 дорівнює 0 і n_4 дорівнює 2. В іншому аспекті гідразинний лінкер H може утворювати при розкладанні два 5-членних саморуйнівних лінкери. В інших аспектах H утворює при розкладанні 5-членний саморуйнівний лінкер, H утворює 7-членний саморуйнівний лінкер або H утворює 5-членний саморуйнівний лінкер і 6-членний саморуйнівний лінкер. На швидкість розкладання впливає розмір

циклу, що утворюється при розкладанні. Таким чином, в залежності від необхідної швидкості розкладання можна вибрати цикл відповідного розміру, який буде виходити при розкладанні.

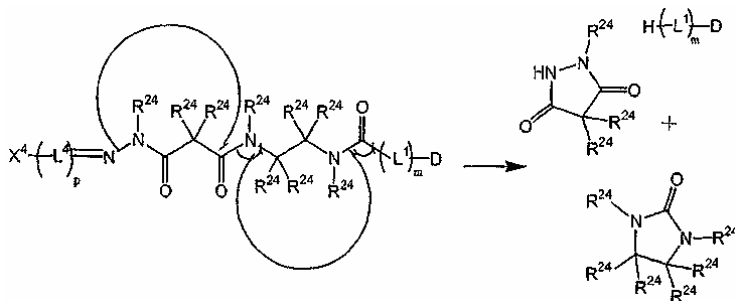
П'ятичленні гідразинні лінкери

В одному варіанті гідразинний лінкер являє собою 5-членний гідразинний лінкер, де H має структуру:

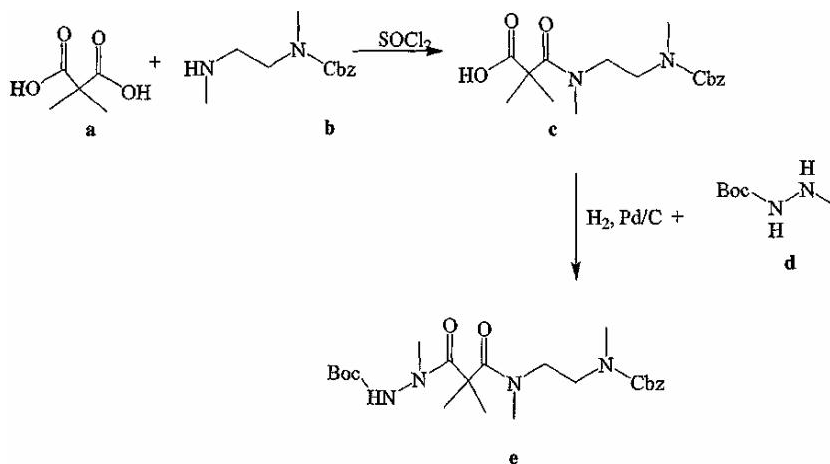


У переважному варіанті, n_1 дорівнює 2, 3 або 4. В іншому переважному варіанті, щ дорівнює 3. В наведений вище структурі кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл. В одному варіанті, кожний R^{24} незалежно означає H або $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкіл. В іншому варіанті, кожний R^{24} незалежно означає H або $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкіл, більш переважно H або CH_3 . В іншому варіанті щонайменше один R^{24} означає метильну групу. В іншому варіанті кожний R^{24} означає H. Кожний R^{24} вибраний для забезпечення сполук стеричними ефектами і для зміни розчинності.

5-Членні гідразинні лінкери можуть зазнавати однієї або більше реакцій циклізації, які відділяють ліки від лінкера, і можуть бути описані, наприклад, таким чином:



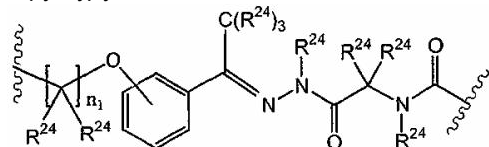
Типовим синтетичним способом одержання п'ятичленного лінкера за даним винаходом є:



Проводять взаємодію Cbz-захищеного DMDA b з 2,2-диметил-малоновою кислотою a в розчині з тіонілхлоридом, одержуючи Cbz-DMDA-2,2-диметилмалонову кислоту c. Проводять взаємодію сполуки c з Boc-N-метилгідразиним d у присутності водню, одержуючи DMDA-2,2-диметилмалоновий Boc-N-метилгідразин є.

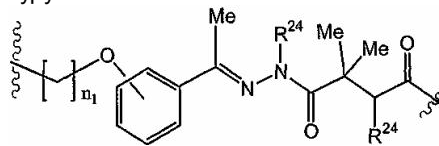
Шестичленні гідразинові лінкери

В іншому варіанті гідразиновий лінкер являє собою 6-членний гідразиновий лінкер, де H має структуру:



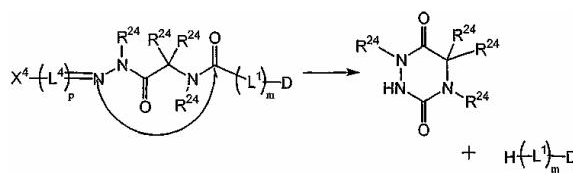
У переважному варіанті щ дорівнює 3. У наведених вище структурі кожний R^{24} являє собою компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл. В одному варіанті кожний R^{24} незалежно означає H або C-алкіл. В іншому варіанті кожний R^{24} незалежно означає H або C-алкіл, більш переважно H або CH_3 . В іншому варіанті щонайменше один R^{24} означає метильну групу. В іншому варіанті кожний R^{24} означає H. Кожний R^{24} вибраний для забезпе-

чення сполук стеричними ефектами і для зміни розчинності. У переважному варіанті H має структуру:

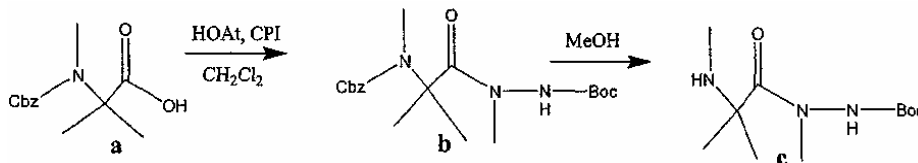


В одному варіанті H має гемінальне диметильне заміщення. В одному варіанті представленої вище структури кожний R^{24} незалежно означає H або заміщений або незаміщений алкіл.

6-Членні гідразинові лінкери піддаються реакції циклізації, яка відділяє ліки від лінкера, і може бути описана таким чином:



Типовим синтетичним способом одержання шестичленного лінкера за даним винаходом є:

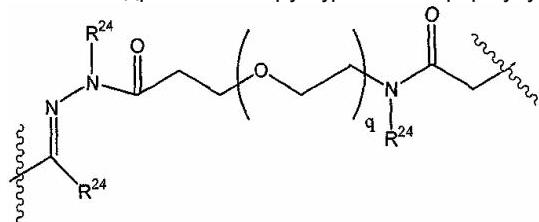


Проводять взаємодію Cbz-захищеного диметилаланіну в розчині з дихлорметаном з HOAt і CPI, одержуючи Cbz-захищений диметилаланінгідрозин b. Видаляють захист з гідрозину b, впливаючи метанолом і одержуючи сполуку c.

Інші гідразинові лінкери

Вважають, що винахід містить лінкер, що має сім компонентів. Даний лінкер, ймовірно, не буде циклізуватись так швидко як п'яти- або шестичленні лінкери, але це може бути переважним для деяких кон'югатів ліки-ліганд. Аналогічно, гідразиновий лінкер може містити два шестичленних цикли або гідразиновий лінкер, що має один шестичленний продукт циклізації і один п'ятичленний. Розглядають також п'яти і семичленний лінкер, а також шести і семичленний лінкер.

Інша гідразинова структура H має формулу:



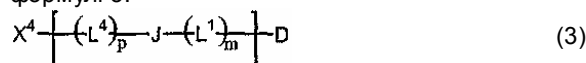
де q дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6; і кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл,

незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл.

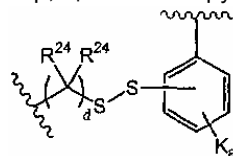
Дана гідразинова структура може також утворювати п'яти-, шести- або семичленні цикли, і можна додавати додаткові компоненти, одержуючи різноманітні цикли.

(3) Дисульфідні лінкери (J)

Ще в одному варіанті лінкер містить ферментативно відщеплювану дисульфідну групу. В одному варіанті винахід стосується цитотоксичної сполуки ліки-ліганд, що має структуру, відповідну формулі 3:



де D, L^1 , L^4 і X^4 такі, як визначено вище і описано тут далі, і J являє собою дисульфідний лінкер, що включає групу, яка має структуру:



де

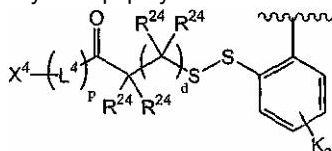
кожний R^{24} означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл і незаміщений гетероалкіл;

кожний К означає компонент, незалежно вибраний з групи, яка включає заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, $\text{NR}^{21}\text{COR}^{22}$, $\text{OCOR}^{21}\text{R}^{22}$, OCOR^{21} і OR^{21} ,

де R^{21} і R^{22} незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл і незаміщений гетероциклоалкіл; а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4; і d дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

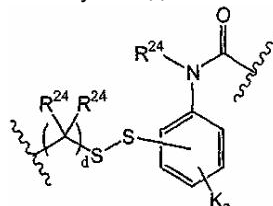
Ароматичний цикл дисульфідного лінкера може бути заміщений однією або декількома групами "К". Група "К" являє собою замісник в ароматичному циклі, який замінює атом водню, в іншому випадку приєднаний до одного з чотирьох незаміщених атомів вуглецю, які є частиною циклічної структури. Група "К" може являти собою окремий атом, наприклад, галоген, або багатоатомну групу, наприклад, алкіл, гетероалкіл, аміно, нітро, гідрокси, алкокси, галогеналкіл і ціано. Типові замісники К незалежно включають, але не обмежені цим, F, Cl, Br, I, NO_2 , OH, OCH_3 , NHCOCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, NHCOCF_3 і метил. Для групи "К_a", а дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3 або 4. В одному переважному варіанті а дорівнює 0.

У переважному варіанті, лінкер містить ферментативно відщеплювану дисульфідну групу наступної формули:

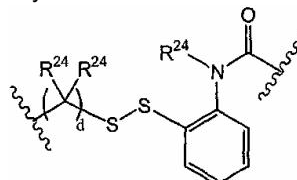


В даному варіанті L^4 , X^4 , p і R^{24} мають такі ж значення, як описано вище, і d дорівнює 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6. В особливому варіанті d дорівнює 1 або 2.

Більш специфічний дисульфідний лінкер показаний у наведеній нижче формулі:

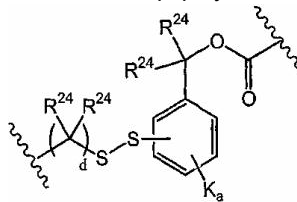


Специфічним прикладом даного варіанту є наступний:

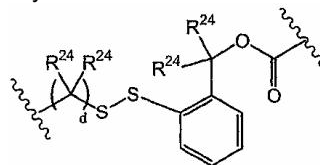


Переважно d дорівнює 1 або 2.

Інший дисульфідний лінкер показаний в наведеній нижче формулі:



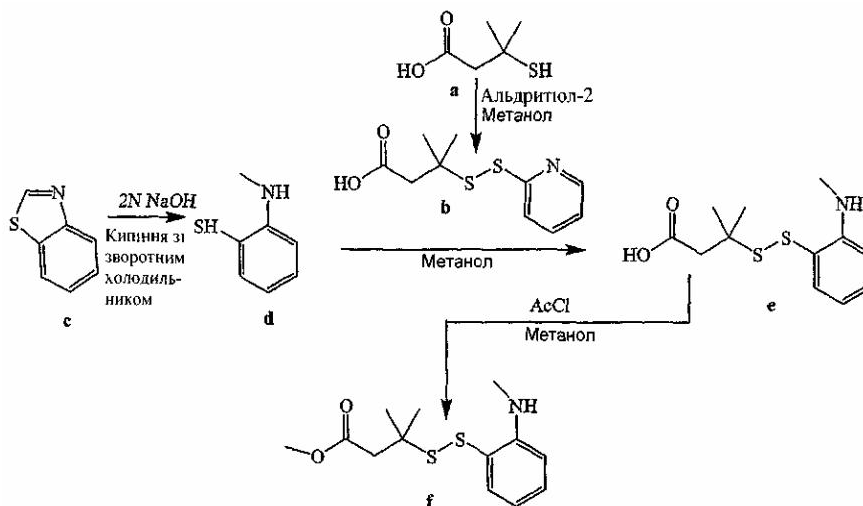
Специфічним прикладом даного варіанту є наступний:



Переважно d дорівнює 1 або 2.

У різних варіантах дисульфідні знаходяться в орто-положенні відносно аміну В іншому специфічному варіанті а дорівнює 0. В переважних варіантах R^{24} незалежно вибраний з Н і CH_3 .

Типовим синтетичним способом одержання дисульфідного лінкера за даним винаходом є наступний:



Проводять взаємодію розчину 3-меркаптопропіонової кислоти з альдритіолом-2, одержуючи 3-метилбензотіазоліййодид b. Проводять взаємодію 3-метилбензотіазоліййодиду з гідроксидом натрію, одержуючи сполуку d. Далі проводять взаємодію розчину сполуки d в метанолі зі сполукою b, одержуючи сполуку e. Видаляють захист зі сполуки e, впливаючи ацетилхлоридом і метанолом, одержуючи сполуку f.

Кон'югат ліки-ліганд за даним винаходом може необов'язково містити два або більше лінкерів. Дані лінкери можуть бути однаковими або різними. Наприклад, можна використати пептидний лінкер для сполуки ліків з лігандом, і другий пептидний лінкер може приєднувати діагностичний агент до комплексу. По-іншому, будь-який з пептидних, гідразинових і дисульфідних лінкерів може зв'язувати комплекс ліків і ліганду, і будь-який з пептидних, гідразинових і дисульфідних лінкерів може приєднувати діагностичний агент до даного комплексу. Інші застосування для додаткових лінкерів включають зв'язування аналітичних агентів, біомолекул, направляючих агентів і міток, що детектуються, з комплексом ліки-ліганд.

В область даного винаходу входять також сполуки даного винаходу, які представляють полі- або багатовалентні типи, включаючи, наприклад, такі типи як димери, тримери, тетрамери і вищі гомологи сполук даного винаходу або їх реакційноздатні аналоги. Полі- і багатовалентний тип може складатись з окремого типу або декількох типів сполуки за даним винаходом. Наприклад, димерна конструкція може бути "гомо-димерною" або "гетеродимерною". Крім того, в область даного винаходу входять полі- і багатовалентні конструкції, в яких сполука даного винаходу або її реакційноздатний аналог приєднана до олігомерного або полімерного каркасу (наприклад, полілізін, декстран, гідроксіетилкрахмаль і подібні). Каркас переважно є поліфункціональним (тобто має набір реакційноздатних сайтів для приєднання сполук за даним винаходом). Крім того, каркас можна піддати дериватизації із застосуванням сполук окремого типу або декількох типів за даним винаходом.

Крім того, даний винахід включає сполуки, в які введені деякі функції для надання сполукам розчинності у воді, яка підвищується у порівнянні з аналогічними сполуками, які не мають подібних функцій. Таким чином, будь-який з вказаних тут замісників можна замінити аналогічними радикалами, які володіють підвищеною розчинністю у воді. Наприклад, в область даного винаходу входить, заміна гідроксильної групи діолом, або аміну - кватернізованим аміном, гідроксіаміном або аналогічним, краще розчинним у воді фрагментом. У переважному варіанті додаткову розчинність у воді надають заміщенням по сайту, несуттєвому для активності вказаних тут сполук по відношенню до іонного каналу, фрагментом, який підвищує розчинність вихідних сполук у воді. Способи підвищення розчинності у воді органічних сполук відомі в даній галузі. Такі способи включають, але не обмежені цим, функціоналізацію органічних ядер постійно зарядженими фрагментами, наприклад,

четвертинним амонієм або групою, яка є зарядженою при фізіологічно придатному pH, наприклад карбоною кислотою, аміном. Інші способи включають додавання до органічних ядер гідроксил- або амінвмісних груп, наприклад, спиртів, поліолів, полімерних простих ефірів і подібних. Типові приклади включають, але не обмежені цим, полілізін, поліетиленімін, поліетиленгліколь і поліпропіленгліколь. Відповідна хімія і стратегія функціоналізації для даних сполук відомі в даній галузі. Дивись, наприклад, роботу [Dunn, R.L., та інш., Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C.1991].

Ліки

Даний винахід стосується ліків, позначених тут "D", як частини кон'югату ліки-ліганд, де ліки пов'язані з лігандом через пептидний, гідразиновий або дисульфідний лінкер. Ліки повинні володіти бажаною біологічною активністю і містити реакційноздатну функціональну групу для зв'язу з лігандом. Бажана біологічна активність включає діагностику, спосіб лікування, полегшення, терапію або профілактику захворювання у тварини, наприклад, у людини. Таким чином, оскільки потрібна наявність реакційноздатної функціональної групи, термін "ліки" відноситься до хімічних реагентів, офіційно визнаних як лікарські засоби у фармакопеї США (United States Pharmacopeia), гомеопатичній фармакопеї США (Homeopathic Pharmacopeia of the United States) або національному зводі правил (National Formulary), або будь-яких його доповненнях. Типові лікарські засоби викладені в Physician's Desk Reference (PDR) і Orange Book, що підтримуються Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (U.S. Food and Drug Administration (FDA)). Нові лікарські засоби постійно відкриваються і розробляються, і даний винахід передбачає, що ці нові ліки також можна включати в комплекс ліки-ліганд за даним винаходом.

Переважні функціональні групи включають первинні або вторинні аміни, гідроксили, сульфгідрили, карбоксили, альдегіди і кетони. Більш переважні функціональні групи включають гідроксили, первинні або вторинні аміни, сульфгідрили і карбоксильні кислотні функціональні групи. Ще більш переважні функціональні групи включають гідроксили, первинні і вторинні аміни і карбоксильні кислотні функціональні групи. Ліки повинні мати щонайменше одну реакційноздатну функціональну групу, але може мати 2, 3, 4, 5, 6 або більше таких груп. Крім того, між реакційноздатною функціональною групою ліків і пептидним, гідразиновим або дисульфідним лінкером можна включити саморуйнівний спейсер L¹.

Кон'югат ліки-ліганд є ефективним для звичайних цілей, для яких ефективні відповідні лікарські засоби, але володіє перевершуючою ефективністю, завдяки властивій ліганду здатності транспортувати ліки до необхідної клітини, де вони особливо корисні.

Типові ліки включають ліки у вигляді білків, пептидів і малих молекул, що містять функціональну групу для зв'язу з лігандом. Більш конкрет-

но, дані ліки включають, наприклад, інгібітори ферментів, такі як інгібітори дигідрофолатредуктази та інгібітори тимідилатсинтази, ДНК-інтеркалятори, агенти розщеплення ДНК, інгібітори тороізомери, ліки сімейства антрацикліну, ліки вінка, мітоміцини, блеоміцини, цитотоксичні нуклеозиди, ліки сімейства птеридину, діїніни, допофілотоксини, стимулятори диференціювання і таксоли.

Переважають ліки за даним винаходом включають цитотоксичні ліки, придатні в лікуванні раку, та інші малі молекули, білки або поліпептиди з необхідною біологічною активністю, наприклад токсин. Ліки можна вибрати таким чином, щоб вони активувались в клітинах пухлини, за допомогою кон'югації з пухлина-специфічним лігандом. Дані пухлина-специфічні кон'югати ліки-ліганд володіють специфічністю відносно пухлини, що з'являється внаслідок специфічності ліганду. Прикладами цього є кон'югати ліки-ліганд, які являють собою високо селективні субстрати для пухлина-специфічних ферментів, де ці ферменти присутні по сусідству від пухлини, в достатніх кількостях для генерації цитотоксичних рівнів вільних ліків поруч з пухлиною. Однією перевагою даних пухлина-специфічних комплексів ліки-ліганд є те, що вони стабільні відносно випадкових протеаз в сироватці людини. Іншою перевагою комплексу ліки-ліганд є те, що вони менш токсичні, ніж відповідні вільні ліки; крім того, специфічність комплексу може дозволити використати менші загальні концентрації у порівнянні з вільними ліками, оскільки внаслідок підвищеної специфічності на місці пухлини буде присутньою більш висока концентрація комплексу.

Цитотоксини

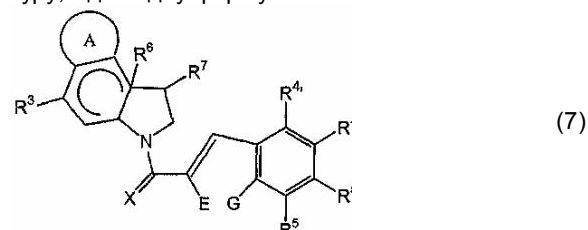
Цитотоксичні ліки, придатні для даного винаходу, включають, наприклад, дуокарміцини, CC-1065 і їх аналоги, включаючи аналоги дуокарміцинів і CC-1065 на основі CBI (1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону), на основі MCBI (7-метокси-1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону) і на основі CCB1 (7-ціано-1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону), доксорубіцин і кон'югати доксорубіцину, таких як морфоліно-доксорубіцин і ціаноморфоліно-доксорубіцин, доластатини, такі як доластатин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, аналоги майтанзину, DM-1, ауристатин Е, ауристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометил ауристатин Е (MMAE), AE-ефір 5-бензоїлвалеріанової кислоти (AEVB), тубулізини, дизоразол, епотилоли, паклітаксел, доцетаксел, SN-38, топотекан, ризоксин, ехіноміцин, колхіцин, вінбластин, віндезин, естрамустин, цемадотин, елеутеробин, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозинарабінозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидаїн, актиноміцин, даунорубіцин і кон'югати даунорубіцину, мітоміцин С, мітоміцин А, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, допофілотоксин і похідні допофілотоксину, такі як етопозид або етопозид-фосфат, вінкрестин, таксол, такотер-ретиноева кислота, масляна кислота, N⁸-ацетилспермідин, камптотекін і їх аналоги. Інші відомі ліки можна модифікувати, щоб забезпечити їх функціональ-

ною групою для кон'югації з описаним тут лінкером. Така хімічна модифікація відома в даній галузі.

Переважають цитотоксини для використання в даному винаході включають: дуокарміцини, CC-1065 і їх аналоги на основі CBI і MCBI, морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, доластатин-10, комбретастатин, каліхеаміцин, майтанзин, DM-1, ауристатин Е, AEB, AEFP, MMAE, тубулізин А, дизоразол, епотилол А і епотилол В.

Особливо переважними цитотоксинами за даним винаходом є активні, сильнодіючі похідні дуокарміцину і CC-1065. Вихідні агенти являють собою виключно ефективні протипухлинні антибіотики, біологічні ефекти яких є результатом оборотного, стереоелектронно-регульованого послідовності-селективного алкілювання ДНК [Boger та інш., J. Org. Chem, 55: 4499 (1990); Boger та інш., J. Am. Chem. Soc. 112: 8961 (1990); Boger та інш., J. Am. Chem. Soc. 113: 6645 (1991); Boger та інш., J. Am. Chem. Soc. 115: 9872 (1993); Boger та інш., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2: 759 (1992)]. Після початкового розкриття дуокарміцинів були зроблені всібічні спроби для роз'яснення селективності дуокарміцинів у відношенні алкілювання ДНК і їх структурного походження.

Особливо переважний аспект даного винаходу стосується цитотоксичної сполуки, що має структуру, відповідну формулі 7:



в якій циклічна система А означає компонент, вибраний із заміщених або незаміщених арильних, заміщених або незаміщених гетероарильних і заміщених або незаміщених гетероциклоалкільних груп. Типові циклічні системи включають феніл і пірол.

Символи Е і G незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, гетероатома, простого зв'язку, або Е і G необов'язково об'єднані, утворюючи циклічну систему, вибрану із заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу.

Символ Х являє собою елемент, вибраний з О, S і NR²³. R²³ означає компонент, вибраний з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу.

Символ R³ являє собою елемент, вибраний з (=O), SR¹¹, NHR¹¹ і OR¹¹, де R¹¹ означає Н, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, C(O)R¹²R¹³, C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, P(O)(OR¹²)₂, C(O)CHR¹²RL³, SR¹² або SiR¹²R¹³R¹⁴. Символи R¹², R¹³ і R¹⁴ незалежно являють собою Н, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл і заміщений або незаміщений арил, де R і R разом з атомом азоту

або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів. Один або більше з R^{12} , R^{13} і R^{14} може містити в своїй структурі відщеплювану групу.

R^4 , R^4 , R^5 і R^5 означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, галогену, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$ і $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20. R^{15} і R^{16} незалежно являють собою H, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, заміщений або незаміщений гетероарил, заміщений або незаміщений гетероциклоалкіл і заміщений або незаміщений пептидил, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів. Одна типова структура являє собою анілін.

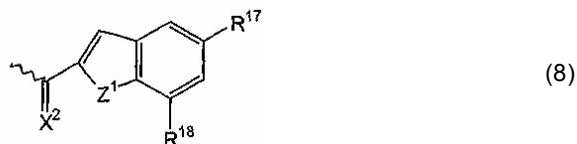
R^4 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} необов'язково містять в своїй структурі одну або більше відщеплюваних груп. Типові відщеплювані групи включають, але не обмежені цим, пептиди, амінокислоти, підрозини і дисульфідні.

Щонайменше один з R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} і R^{16} використовують для приєднання ліки до лінкера за даним винаходом, як тут описано, наприклад, до L^1 , якщо присутній, або до F, H або J.

Ще в одному типовому варіанті щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} несе реакційноздатну групу, придатну для кон'югації даної сполуки. Ще в одному типовому варіанті R^4 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} або R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного алкілу і заміщеного гетероалкілу і мають реакційноздатну функціональну групу на вільному кінці алкільного або гетероалкільного фрагмента. Один або декілька з R^4 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{15} і R^{16} можна кон'югувати з іншим видом, наприклад, направляючим агентом, міткою, що детектується, твердим носієм та інш.

Як буде ясно з наведеного тут обговорення, якщо щонайменше один з R^{15} і R^{16} містить реакційноздатну функціональну групу, то ця група може являти собою компонент зв'язку між ліками та іншою молекулою. У типовому варіанті, де щонайменше один з R^{15} і R^{16} містить зв'язок між ліками та іншим видом, то щонайменше один з R^{15} і R^{16} являє собою фрагмент, який відщеплюється ферментом.

Ще в одному типовому варіанті щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 , R^5 являє собою:

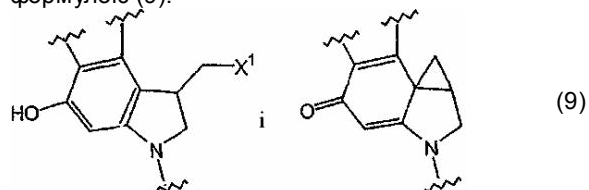


У формулі 8 символи X і Z являють собою компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR^{23} . Групи R^{17} і R^{18} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, галогену, NO_2 , $NR^{19}R^{20}$, $NC(O)R^{19}$, $OC(O)NR^{19}$, $OC(O)OR^{19}$, $C(O)R^{19}$, SR^{19} або OR^{19} , за умови, що щонайменше один з R^{12} , R^{13} , R^{19} або R^{20} містить лінкер за даним винаходом, який тут описаний.

Символи R^{19} і R^{20} незалежно являють собою заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, заміщений або незаміщений гетероарил, заміщений або незаміщений гетероциклоалкіл, заміщений або незаміщений пептидил, де R^{19} і R^{20} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів, за умови, що якщо Z^1 означає NH, то обидва R^{17} і R^{18} не є H, і R^{17} не є NH_2 . Протягом всьому даного опису символи R^{19} і R^{20} також охоплюють групи, вказані для R^4 і R^5 . Таким чином, в область даного винаходу включено забезпечення сполук, що мають дві або більше з вказаних безпосередньо вище конденсованих феніл-гетероциклічних циклічних систем, пов'язаних в серію, або конденсований цикл в комбінації з лінкером. Крім того, у варіантах, де присутній лінкер, він може бути присутнім як замісник R^4 , R^4 , R^5 або R^5 або як замісник R^{17} і R^{18} .

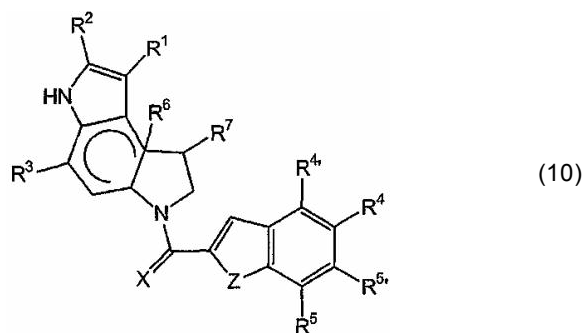
R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній. Якщо R^6 присутній, то R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце. R^7 означає CH_2-X^1 або $-CH_2-$. Якщо R^7 означає $-CH_2-$, то він є компонентом циклопропанового циклу. Символ X являє собою відхідну групу, таку як галоген, наприклад, Cl, Br або F. Комбінації R^6 і R^7 інтерпретують таким чином, який не порушує принципи хімічної валентності.

Крива лінія всередині шестичленного циклу показує, що цикл може мати одну або більше мір ненасиченості, і може бути ароматичним. Таким чином, циклічні структури, такі як структури, викладені нижче, і споріднені структури охоплюються формулою (9):



У типовому варіанті циклічна система A являє собою заміщений або незаміщений фенільний цикл. Циклічна система A переважно є заміщеною одним або декількома замісниками для арильної групи, як викладено тут в розділі визначень. В одному переважному варіанті фенільний цикл є заміщеним фрагментом CN або метокси.

В іншому типовому варіанті винахід стосується сполуки, що має структуру, відповідну формулі 10:



У даному варіанті радикали R^3 , R^4 , R^4 , R^5 , R^5 , R^6 , R^7 і X по суті ідентичні описаним вище. Символ Z означає компонент, незалежно вибраний з O , S і NR^{23} . Символ R^{23} означає елемент, вибраний з H , заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу. Кожний R^{23} вибраний незалежно. Символ R^1 означає H , заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або $C(O)R^8$ або CO_2R^8 . R^8 означає елемент, вибраний з NR^9R^{10} , NR^9NHR^{10} і OR^9 , R^9 і R^{10} незалежно вибрані з H , заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу.

Радикал R^2 означає H або заміщений або незаміщений нижчий алкіл. Звичайно переважно, якщо R являє собою заміщений алкіл, він відрізняється від перфторалкілу, наприклад, CF_3 . В одному варіанті R^2 являє собою заміщений алкіл, де замісник не є галогеном. В іншому варіанті R^2 означає незаміщений алкіл.

Як обговорюється вище, X^1 може бути відхідною групою. Придатні відхідні групи включають, але не обмежені цим, галогени, азиди, сульфонові ефіри (наприклад, алкілсульфоніл, арилсульфоніл), іони оксонію, алкілперхлорати, складні ефіри амоніоалкансульфонати, алкілфторсульфонати і фторовані сполуки (наприклад, трифлати, нонафлати, трезилати) і подібні. Конкретними галогенами, придатними як відхідні групи, є F , Cl і Br . Вибір даних та інших відхідних груп, придатних для конкретного набору реакційних умов, входить в область можливостей фахівця в даній галузі [дивись, наприклад, March J. *Advanced Organic Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, 1992; Sandier SR, Karo W, *Organic Functional Group Preparations*, 2nd Edition, Academic Press, Inc., 1983; і Wade LG, *Compendium of Organic Synthetic Methods*, John Wiley and Sons, 1980].

У типовому варіанті R^1 означає складноефірний фрагмент, такий як CO_2CH_3 . Ще в одному типовому варіанті, R^2 означає нижчу алкільну групу, яка може бути заміщеною або незаміщеною. У цей час переважно нижчою алкільною групою є CH_3 . Ще в одному варіанті R^1 означає CO_2CH_3 , і R означає CH_3 .

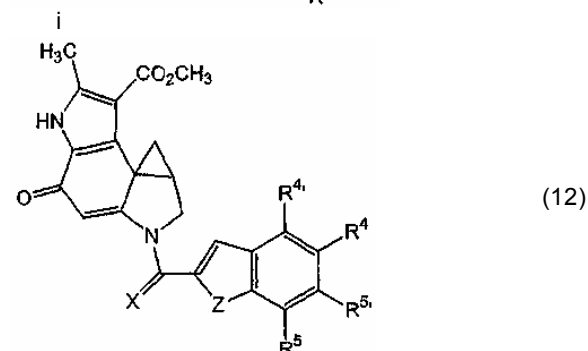
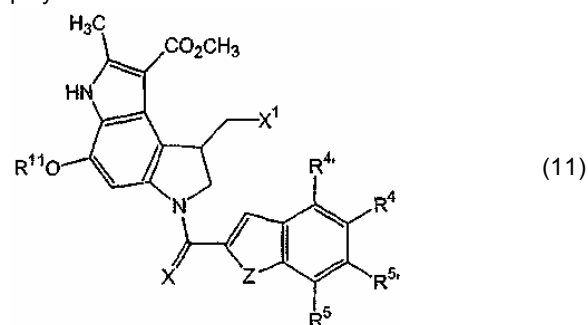
Ще в одному типовому варіанті R^4 , R^4 , R^5 , R^5 являють собою компоненти, незалежно вибрані з H , галогену, NH_2 , OMe , $O(CH_2)_2N(Me)_2$ і NO_2 .

В одному варіанті ліки вибрані таким чином, що відхідна група X^1 являє собою компонент, вибраний з групи, яка включає галоген, алкілсульфоніл, арилсульфоніл і азид. В іншому варіанті Z означає O . В деяких варіантах R^1 може бути CO_2CH_3 або R^2 може бути CH_3 ; крім того, R^1 може

бути CO_2CH_3 , і R^2 може бути CH_3 . Один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 може являти собою $C(O)R^{15}$ та інші три з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 являють собою H . Крім того щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 може відрізнитись від елемента, вибраного з H і OCH_3 . В одному варіанті R^4 , R^4 , R^5 і R^5 являють собою компоненти, незалежно вибрані з H , галогену, NH_2 , $O(CH_2)_2N(Me)_2$ і NO_2 .

У переважному варіанті один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 являє собою $O(CH_2)_2N(Me)_2$, та інші з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 означають H . В іншому варіанті R^7 означає CH_2X^1 , де X^1 являє собою F , Cl або Br , і R^6 відсутній.

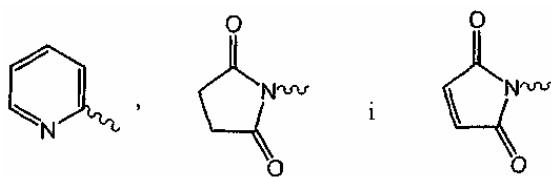
Ще в одному типовому варіанті винахід стосується сполук, що мають структуру, відповідну формулам 11 і 12:



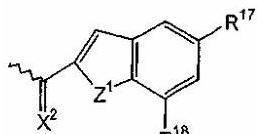
В одному варіанті наведеної вище формули X переважно означає O ; і Z переважно означає O . В іншому варіанті Z означає NR^{23} або O . По-іншому, один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 може являти собою $O(CH_2)_2N(Me)_2$, тоді як інші три з R^4 , R^4 , R^5 або R^5 являють собою H . В одному варіанті R^4 , R^4 , R^5 або R^5 можуть бути вибрані з групи, яка включає R^{29} , $COOR^{29}$, $C(O)NR^{29}$ і $C(O)NNR^{29}$, де R^{29} вибраний з групи, яка включає H , OH , заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений циклоалкіл, незаміщений циклоалкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, заміщений циклогетероалкіл, незаміщений циклогетероалкіл, заміщений гетероарил і незаміщений гетероарил.

В іншому варіанті наведеної вище формули X переважно означає O , Z переважно означає O , R^1 переважно означає CO_2CH_3 , R^7 переважно означає CH_2Cl , R^2 переважно означає CH_3 , R^3 переважно означає OH . По-іншому, один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 може являти собою $NHC(O)(C_6H_4)NH_2$, тоді як інші три з R^4 , R^4 , R^5 або R^5 означають H .

В одному варіанті R можна вибрати з групи, яка включає:



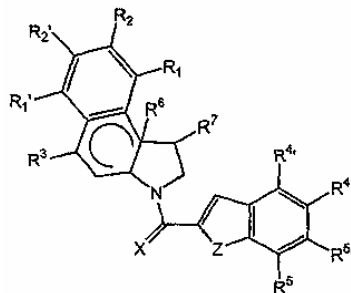
Ще в одному варіанті ліків один елемент, вибраний з R і R', являє собою:



де X і Z¹ являють собою компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR²³; R¹⁷ і R¹⁸ являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає H, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, заміщений або незаміщений гетероарил, заміщений або незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO₂, NR¹⁹R²⁰, NC(O)R¹⁹, OC(O)NR¹⁹, OC(O)OR¹⁹, C(O)R¹⁹, OR¹⁹, і O(CH₂)_nN(CH₃)₂. В даному варіанті η дорівнює цілому числу від 1 до 20; R¹⁹ і R²⁰ незалежно вибрані із заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, де R¹⁹ і R²⁰ разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів, де один з R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁹ або R²⁰ зв'язує вказані ліки з L¹, якщо присутній, або з F. В одному переважному варіанті X² означає O і Z¹ означає O або NR²³.

Іншою переважною структурою аналога дуокарміцину формули 7 є структура, в якій циклічна система А являє собою незаміщене або заміщене фенільне кільце. Переважні замісники в молекулі описаних тут вище ліків для структури формули 7, коли циклічна система А являє собою пірол, також є переважними замісниками, якщо циклічна система А являє собою незаміщене або заміщене фенільне кільце.

Наприклад, в переважному варіанті ліки (D) мають структуру:



В даній структурі R³, R⁶, R⁷, X є такими, як описано вище для формули 7.

Крім того, Z означає компонент, вибраний з O, S і NR²³, де R²³ означає компонент, вибраний з H,

заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R¹ означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл, C(O)R⁸ або CO₂R⁸, де R⁸ означає елемент, вибраний з NR⁹R¹⁰ і OR⁹, в яких R⁹ і R¹⁰ означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R¹ означає H, заміщений або незаміщений нижчий алкіл або C(O)R⁸, де R⁸ означає елемент, вибраний з NR⁹R¹⁰ і OR⁹, в яких R⁹ і R¹⁰ означають компоненти, незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

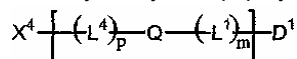
R² означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси; і

R² означає H, або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл.

Щонайменше, один з R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁵ і R¹⁶ зв'язує ліки з L¹, якщо присутній, або з F, H або J.

У переважному варіанті один з R⁴, R⁴, R⁵ і R⁵ являє собою O(CH₂)₂N(Me)₂, та інші з R⁴, R⁴, R⁵ і R⁵ являють собою H. В іншому варіанті R⁷ означає CH₂-X¹, де X¹ означає F, Cl або Br, і R⁶ відсутній.

В одному варіанті, винахід стосується цитотоксичної сполуки ліки-ліганд, що має структуру, відповідну наступній формулі:



в якій символ L¹ означає саморуйнівний спейсер, де m дорівнює цілому числу з 0, 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

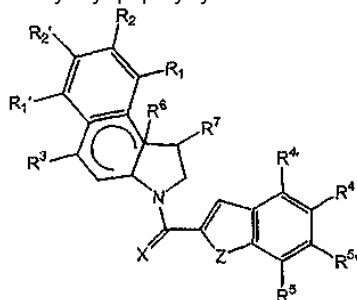
Символ X⁴ означає елемент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, незахищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти.

Символ L⁴ являє собою лінкерний елемент, і p дорівнює 0 або 1. L⁴ являє собою фрагмент, який додає кон'югатам підвищеність або зниженість агрегаційні властивості. Приклади компонентів L⁴ включають заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероалкіл або незаміщений гетероалкіл, будь-який з яких може бути лінійним, розгалуженим або циклічним, позитивно або негативно зарядженим амінокислотним полімером, таким як полілізін або поліаргінін, або іншими полімерами, такими як поліетиленгліколь.

Символ Q являє собою відщеплюваний лінкер, що включає, але не обмежений цим, будь-які описані тут пептидні, гідрозонові і дисульфідні лінкери. Інші придатні лінкери включають, але не обмежені цим, лінкери, [описані в патенті США №6214345; публікаціях патентних заявок США №№2003/0096743, 2003/0130189 і 2004/121940; публікаціях РСТ-патентних заявок №№WO 03/026577 і WO 04/043493; і публікаціях Європейських патентних заявок №№EP 1243276 і EP 1370298], які всі включені тут у вигляді посилань. Відщеплювані лінкери включають лінкери, які можуть селективно відщеплюватись хімічними або біологічними способами і при розкладанні відділяти ліки D¹ від X⁴. Розкладання може відбуватись

де-небудь вздовж довжини лінкера або по будь-якому кінцю лінкера.

Символ D^1 означає лікарський засіб, що має наступну формулу:



де X і Z означають компоненти, незалежно вибрані з O , S і NR^{23} ;

R^{23} означає компонент, вибраний з H , заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу;

R^1 означає H , заміщений або незаміщений нижчий алкіл, $C(O)R^8$ або CO_2R^8 ;

R^1 означає H , заміщений або незаміщений нижчий алкіл або $C(O)R^8$;

де R^8 означає компонент, вибраний з NR^9R^{10} і OR^9 , і R^9 і R^{10} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H , заміщеного або незаміщеного алкілу і заміщеного або незаміщеного гетероалкілу;

R^2 означає H , або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл, або ціано, або алкокси;

R^2 означає H , або заміщений або незаміщений нижчий алкіл, або незаміщений гетероалкіл,

R^3 означає компонент, вибраний з групи, яка включає SR^{11} , NHR^{11} і OR^{11} , де R^{11} являє собою компонент, вибраний з групи, яка включає H , заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений гетероалкіл, незаміщений гетероалкіл, дифосфати, трифосфати, ацил, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} і $SiR^{12}R^{13}R^{14}$, в яких R^{12} , R^{13} і R^{14} являють собою компоненти, незалежно вибрані з H , заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного арилу, де R^{12} і R^{13} разом з атомом азоту або вуглецю, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

де щонайменше один з R^{11} , R^{12} і R^{13} зв'язує вказаний лікарський засіб з L^1 , якщо присутній, або з Q ;

R^6 означає простий зв'язок, який присутній або відсутній, і, якщо присутній, то R^6 і R^7 об'єднані, утворюючи циклопропільне кільце; і

R^7 означає CH_2-X^1 або $-CH_2-$, об'єднаний у вказаному циклопропільному кільці з R^6 , де X^1 означає відхідну групу,

R^4 , R^5 і R^5 являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає H , заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл,

незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15} , OR^{15} , $CR^{15}=NR^{16}$ і $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

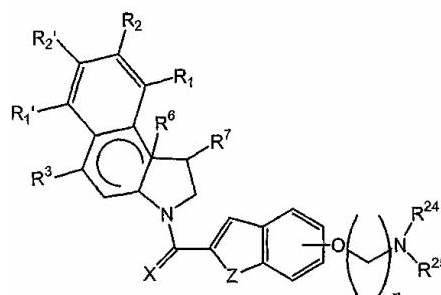
R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H , заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу і заміщеного або незаміщеного пептидилу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів;

і R^{24} і R^{25} незалежно вибрані з незаміщеного алкілу, і

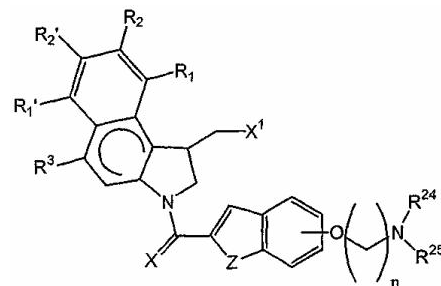
де щонайменше один з R^4 , R^4 , R^5 і R^5 означає $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$.

У деяких варіантах n дорівнює 2. В деяких варіантах R^{24} і R^{25} являють собою метил. У деяких варіантах R^4 означає $O(CH_2)_nNR^{24}R^{25}$, і R^4 , R^5 і R^5 являють собою H . В деяких варіантах R^4 означає $O(CH_2)_2N(CH_3)_2$ і R^4 , R^5 і R^5 являють собою H . В деяких варіантах Q являє собою лінкер, вибраний з F , H і J , який описаний вище. У деяких варіантах R^1 , R^1 , R^2 і R^2 являють собою H .

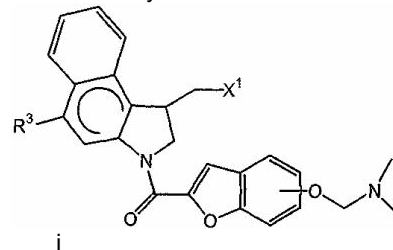
Переважаючою формулою для ліків D^1 є наступна:

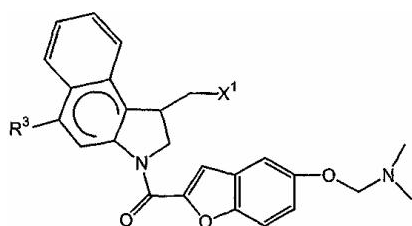


Іншим переважним варіантом ліків D^1 є наступний:

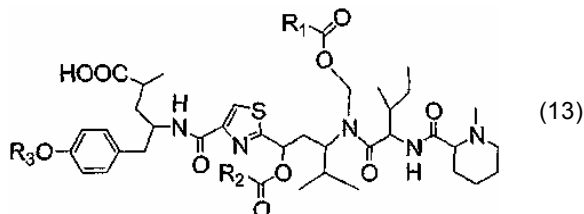


Ще додатковими переважними варіантами ліків D^1 є наступні:





В іншому типовому варіанті даного винаходу цитотоксичними ліками може бути аналог тубулізину або споріднена сполука, наприклад, сполуки, що описуються структурою, відповідною формулі 13:

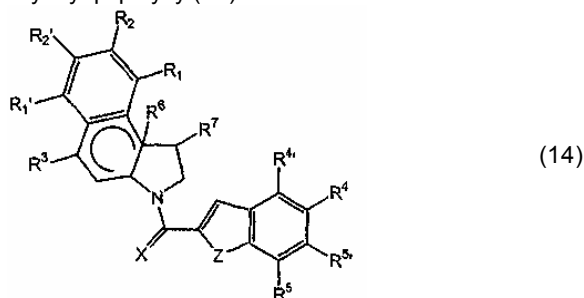


де R^1 і R^2 означають Н або нижчий алкіл, або, більш конкретно, ізобутил, етил, пропіл або трет-бутил, і R^3 означає Н або ОН. Тубулізин і його застосування при лікуванні раку описані, [наприклад, в РСТ-публікаціях WO 2004/005327 і WO 2004/005326]. Одержання сполук тубулізину описане в [DE10008089]. Способи, які можна застосовувати для зв'язування тубулізину з різними лінкерами даного винаходу, наведені у прикладах. Переважними аналогами тубулізину є тубулізини А-Ф.

Аналоги СБІ

Дані конкретні сполуки являють собою аналоги СБІ, оскільки вони включають 1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-он (СБІ)-алкілюючий домен або алкілюючу під одиницю. Дані сполуки можна використати як ліки. Переважні ліки за даним винаходом включають цитотоксичні ліки, придатні при лікуванні раку. Дані сполуки можуть бути кон'юговані або ні або включати лінкери, які описані вище. Цитотоксичні ліки, придатні в даному винаході, включають, наприклад, аналоги на основі СБІ (1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону), аналоги на основі МСБІ (7-метокси-1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону) і аналоги на основі ССБІ (7-ціано-1,2,9,9а-тетрагідроциклопропа[с]бенз[е]індол-4-ону).

В одному варіанті сполука винаходу має наступну формулу (14):



Як обговорюється вище, X^1 може бути відхідною групою. Придатні відхідні групи включають, але не обмежені цим, галогени, азиди, сульфонові ефіри (наприклад, алкілсульфоніл, арилсульфоніл), іони оксонію, алкілперхлорати, амоніоалкансульфонатні складні ефіри, алкілфторсульфонати і фторовані сполуки (наприклад, трифлати, нонафлати, трезилати) і подібні. Конкретні галогени, придатні як відхідні групи, являють собою F, Cl і Br. Вибір даних та інших відхідних груп, придатних для конкретного набору реакційних умов входить в область можливостей фахівця в даній галузі [дивись, наприклад, March J, Advanced Organic Chemistry, 2nd Edition, John Wiley and Sons, 1992; Sandier SR, Karo W, Organic Functional Group Preparations, 2nd Edition, Academic Press, Inc., 1983; і Wade LG, Compendium of Organic Synthetic Methods, John Wiley and Sons, 1980].

У деяких варіантах R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ являють собою компоненти, незалежно вибрані з H, галогену, NH_2 , OMe, $O(CH_2)_2N(Me)_2$ і NO_2 . У деяких варіантах щонайменше один з R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ означає $O(CH_2)_2N(Me)_2$. У деяких варіантах один з R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ означає $O(CH_2)_2N(Me)_2$ та інші з R^4 , $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ являють собою H. В інших варіантах R^4 означає $O(CH_2)_2N(Me)_2$ і $R^{4'}$, R^5 і $R^{5'}$ являють собою H.

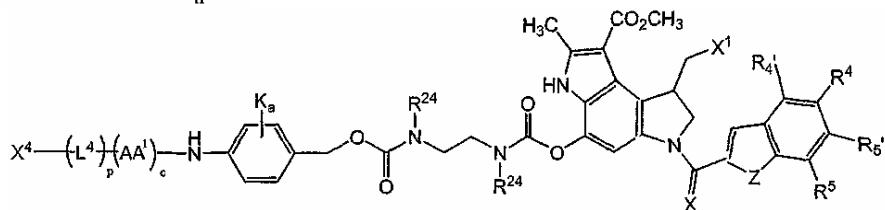
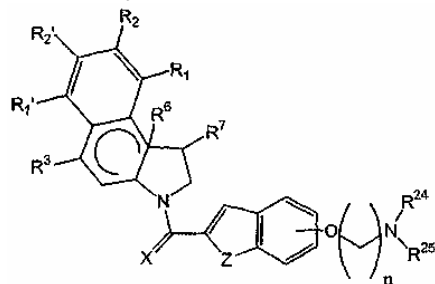
У деяких варіантах R^7 являє собою CH_2-X^1 , де X^1 означає F, Cl або Br, і R^6 відсутній. У деяких варіантах ліки вибрані таким чином, що відхідна група X^1 означає компонент, вибраний з групи, яка включає галоген, алкілсульфоніл, арилсульфоніл і азид. У деяких варіантах X^1 означає Cl або Br.

У деяких варіантах Z означає O. В деяких варіантах X і Z являють собою O.

У деяких варіантах R означає H, метил або ціано, і R^1 , $R^{1'}$ і R^2 являють собою H. В деяких варіантах R^1 , $R^{1'}$, R^2 і R^2 означають H. В деяких варіантах R^1 , $R^{1'}$ і R^2 означають H.

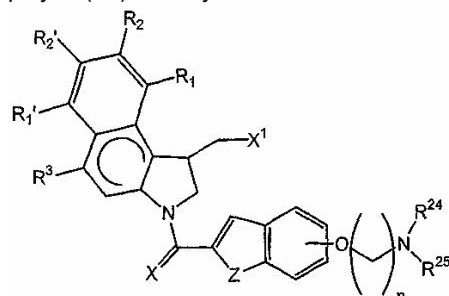
У деяких варіантах R являє собою реакційноздатну групу, яка описана нижче.

Переважаючою формулою для сполуки формули (14) є наступна:

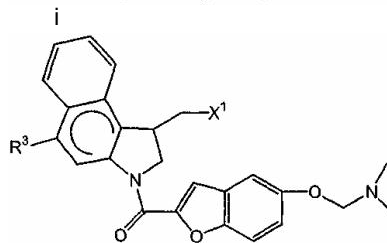
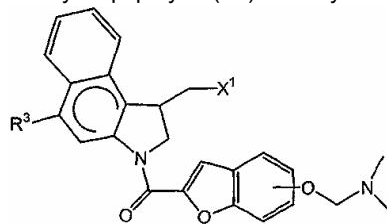


або

Іншим переважним варіантом для сполуки формули (14) є наступний:



Додатковими переважними варіантами для сполуки формули (14) є наступні:

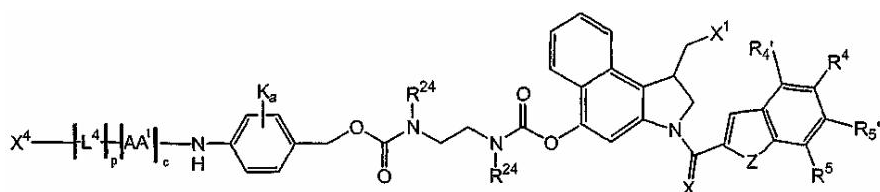


Переважні кон'югати дуокарміцину і СВІ

Пептидні, гідразинні або дисульфідні лінкери за даним винаходом можна використати в кон'югатах, що містять як цитотоксичні агенти аналогів дуокарміцину або СВІ. Переважні кон'югати даного винаходу описані нижче з додатковими подробицями. Поки не указано по-іншому, замісники визначені, як викладено вище в розділах, що стосуються цитотоксинів, пептидних лінкерів, гідразинних лінкерів і дисульфідних лінкерів.

А. Кон'югати з пептидними лінкерами

У переважному варіанті винахід стосується кон'югату з пептидним лінкером, що має структуру:



де Х означає галоген;

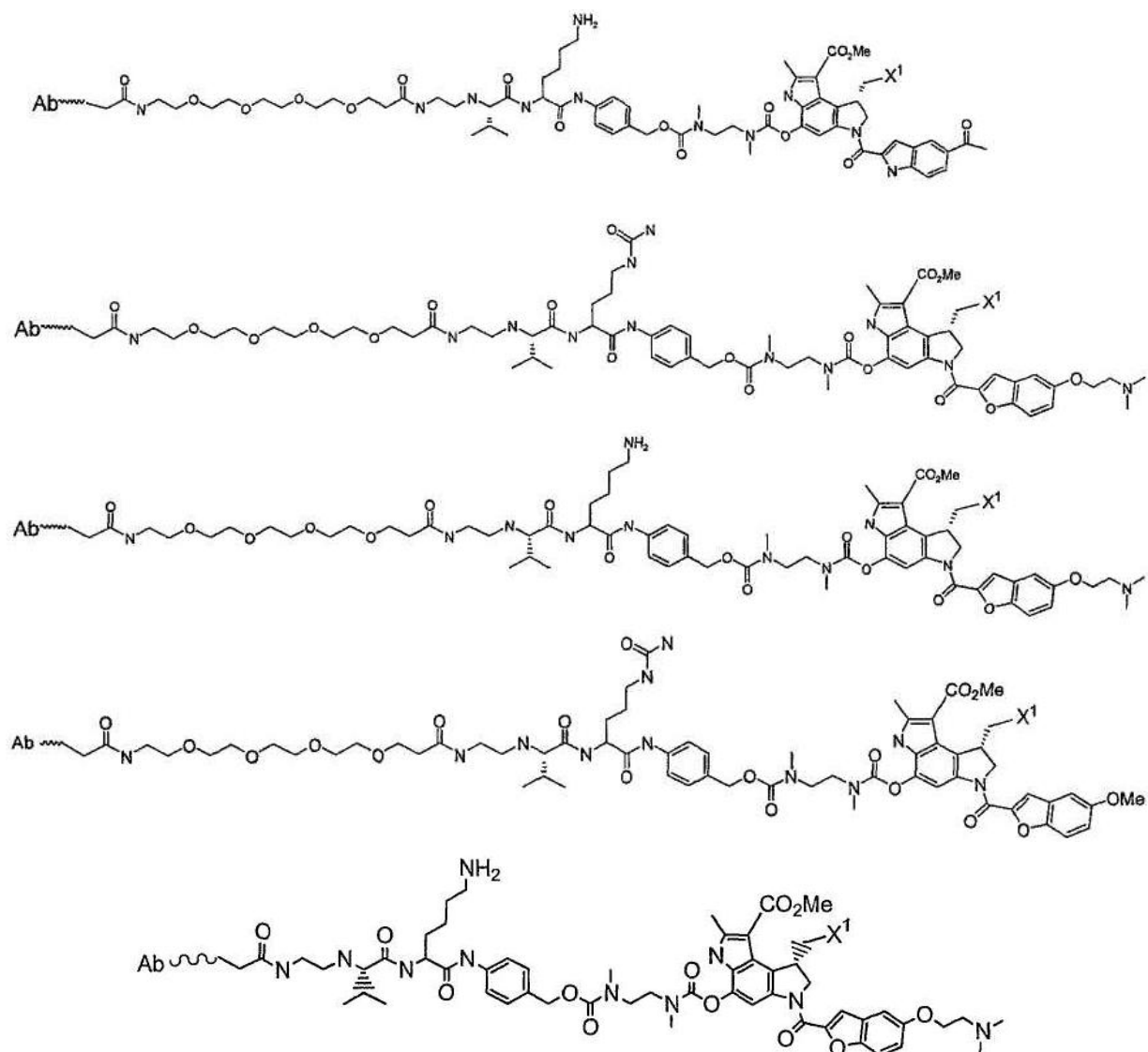
Х означає компонент, вибраний з О, S і NR^{23} ;

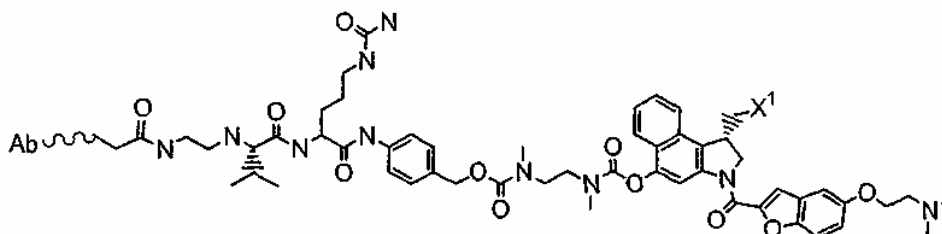
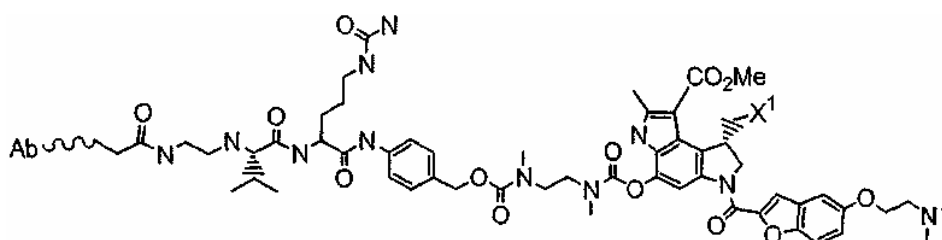
R^{23} означає компонент, вибраний з Н, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкіл і ацил; і

R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 і $\text{R}^{5'}$ являють собою компоненти, незалежно вибрані з групи, яка включає Н, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, NC(O)R^{15} , $\text{OC(O)NR}^{15}\text{R}^{16}$, OC(O)OR^{15} , C(O)R^{15} , OR^{15} і $\text{O(CH}_2)_n\text{N(CH}_3)_2$, де n дорівнює цілому числу від 1 до 20; і

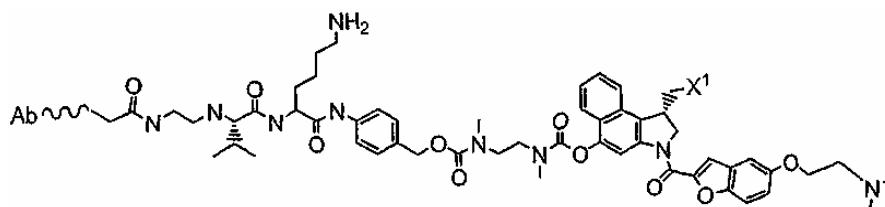
R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з Н, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкілну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів.

Необмежувальні приклади таких кон'югатів включають наступні структури:



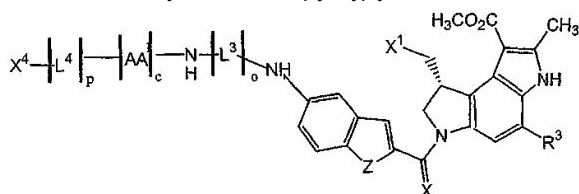


i

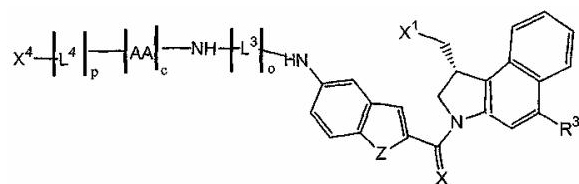
де X^1 означає Cl або Br; i

де Ab являє собою антитіло або його фрагмент.

В іншому переважному варіанті винахід стосується кон'югату, що має структуру:



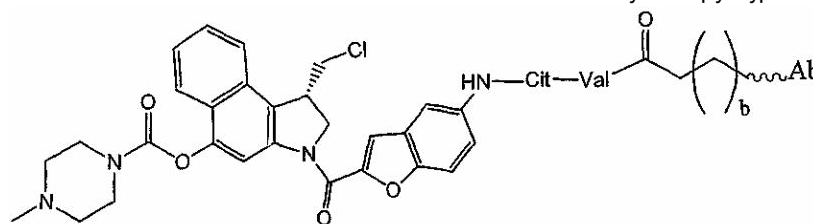
або

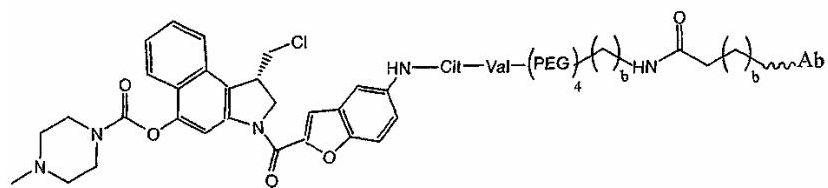
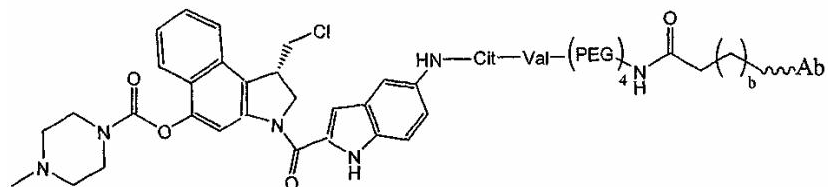
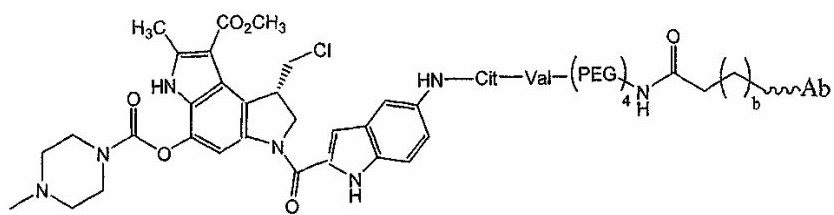
де X^1 означає відхідну групу;Z і X являють собою компоненти, незалежно вибрані з O, S і NR^{23} ,де R^{23} означає компонент, вибраний з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і ацилу; i R^3 вибраний з групи, яка включає H, заміщений алкіл, незаміщений алкіл, заміщений арил, незаміщений арил, заміщений гетероарил, незаміщений гетероарил, заміщений гетероциклоалкіл, незаміщений гетероциклоалкіл, галоген, NO_2 , $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, OR^{15} і $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$,

де n дорівнює цілому числу від 1 до 20;

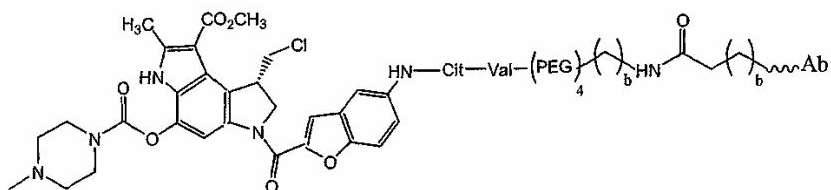
 R^{15} і R^{16} незалежно вибрані з H, заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного гетероарилу і заміщеного або незаміщеного гетероциклоалкілу, де R^{15} і R^{16} разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, необов'язково об'єднуються, утворюючи заміщену або незаміщену гетероциклоалкільну циклічну систему, яка має від 4 до 6 компонентів, що необов'язково містить два або більше гетероатомів.

Необмежувальні приклади таких кон'югатів включають наступні структури:



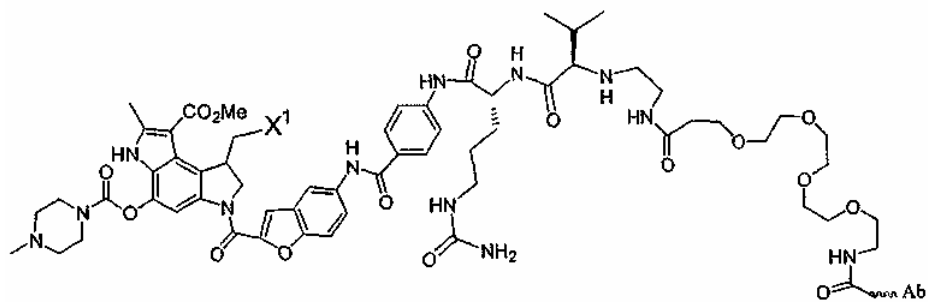
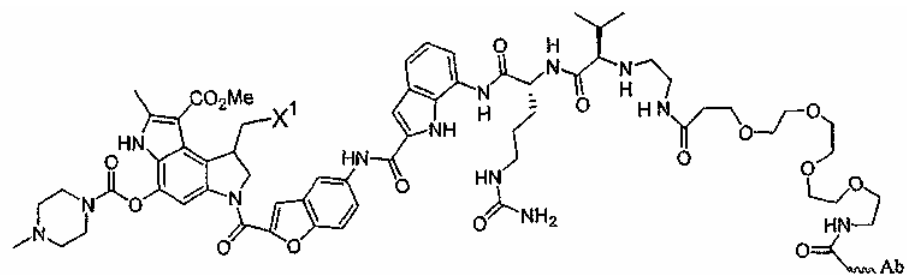


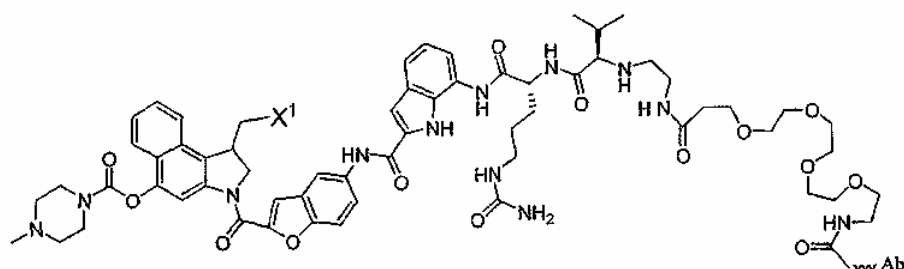
i



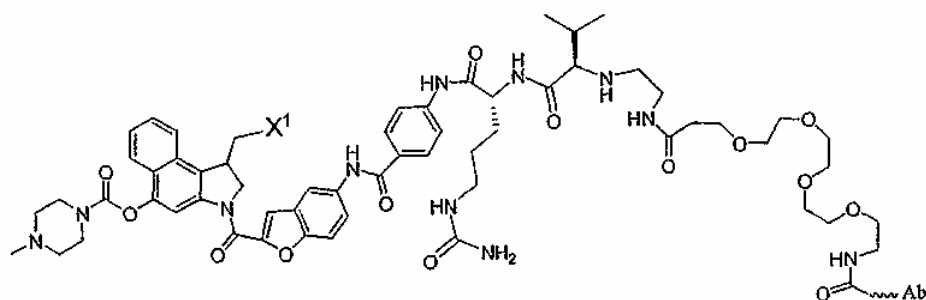
де кожний b незалежно дорівнює цілому числу від 0 до 20, і Ab означає антитіло, або його фрагмент.

В інших переважних варіантах винахід стосується кон'югату з пептидним лінкером, вибраного з наступних структур:



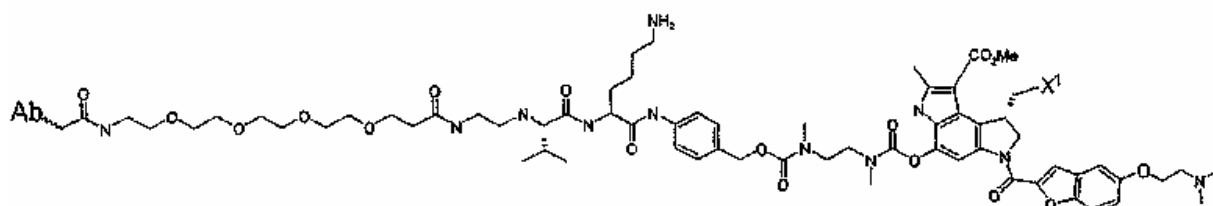
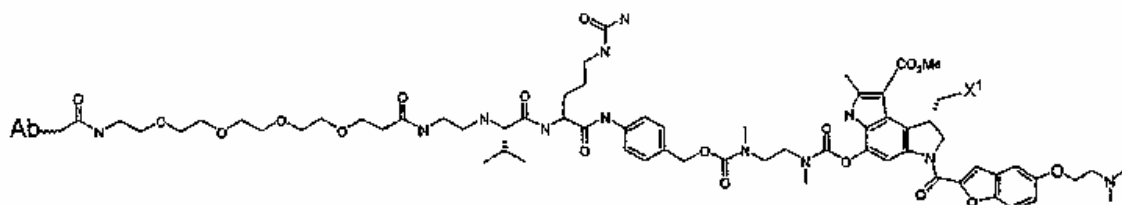
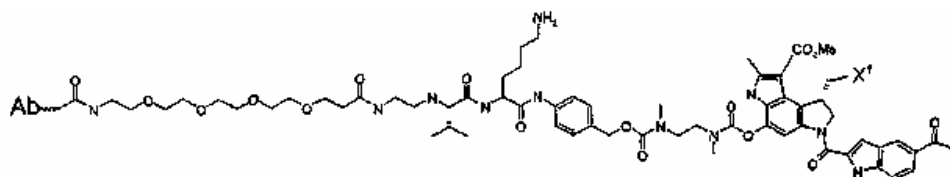


1

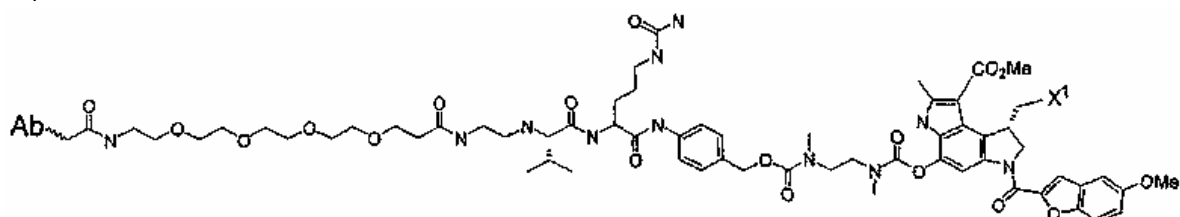


де X^1 означає Cl або Br, і Ab означає антитіло або його фрагмент. В інших варіантах винахід сто-

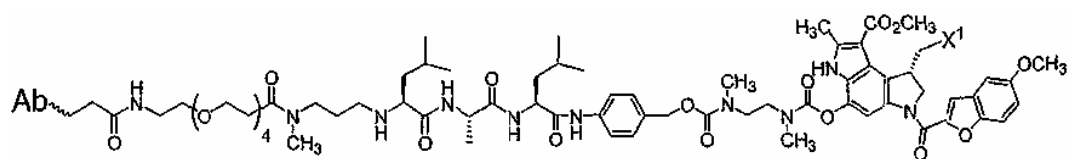
сується кон'югату з пептидним лінкером, вибрано-го з наступних структур:



i



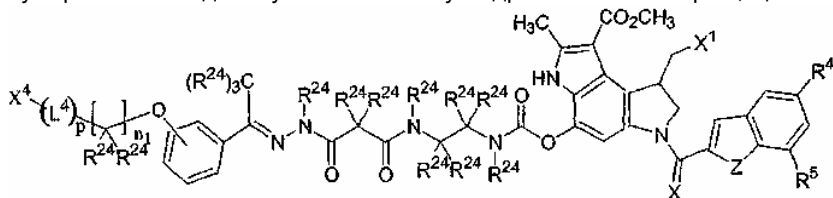
де X^1 означає Cl або Br і Ab означає антитіло або його фрагмент. В інших варіантах винахід стосується кон'югату з пептидним лінкером, що має наступну структуру:



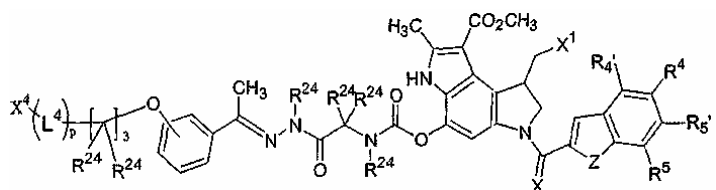
де X^1 означає Cl або Br і Ab означає антитіло або його фрагмент.

В. Кон'югати з гідразинними лінкерами

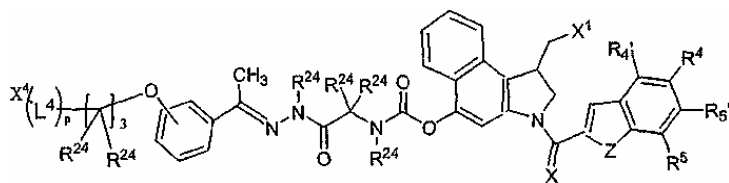
У переважному варіанті винахід стосується кон'югату з гідразинним лінкером, що має структуру:



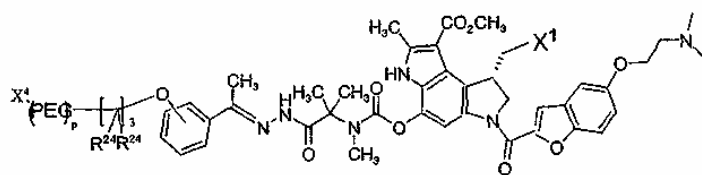
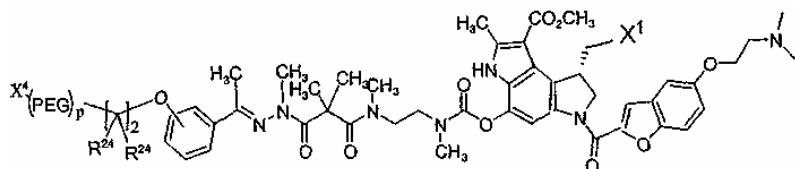
В іншому переважному варіанті, винахід стосується кон'югату з гідразинним лінкером, що має структуру:



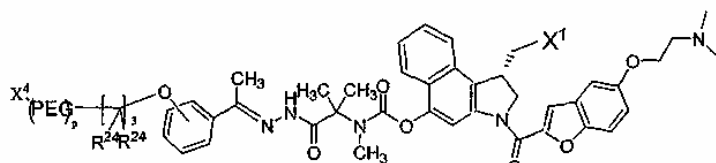
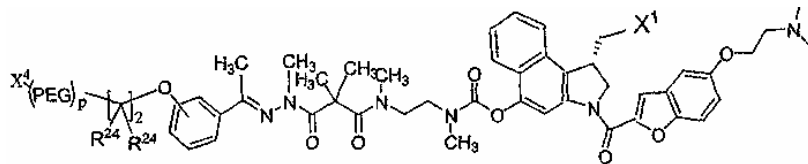
i



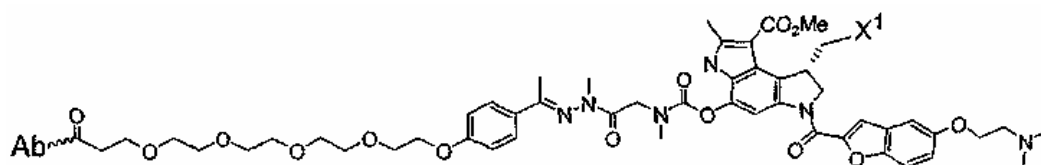
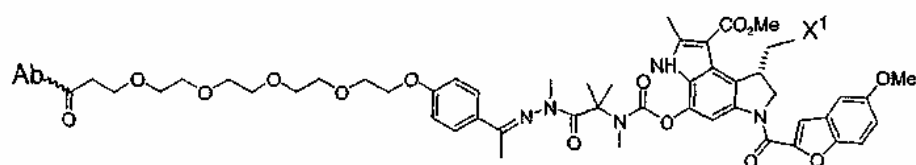
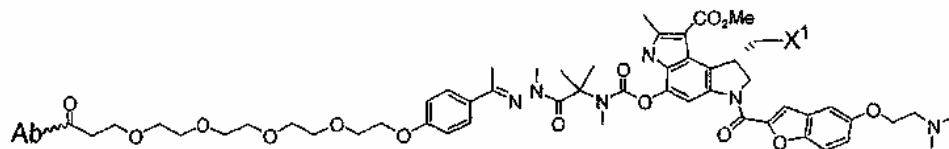
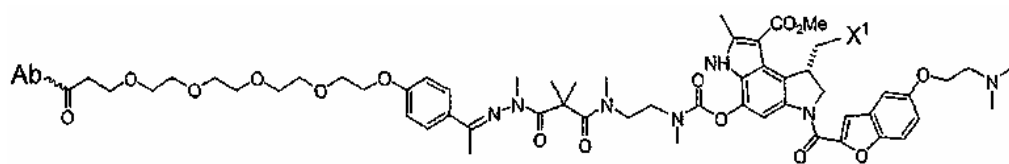
В інших переважних варіантах винахід стосується кон'югату з гідразинним лінкером, що має структуру, вибрану з:



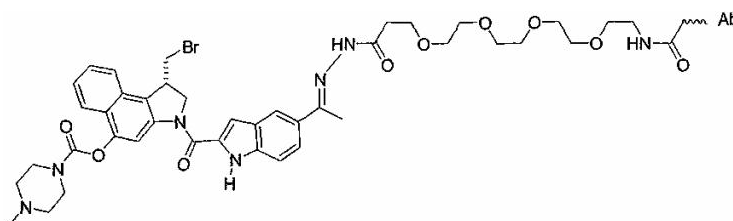
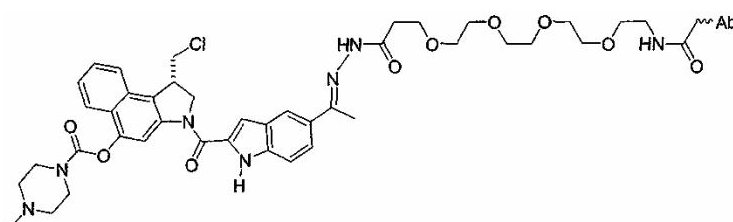
i



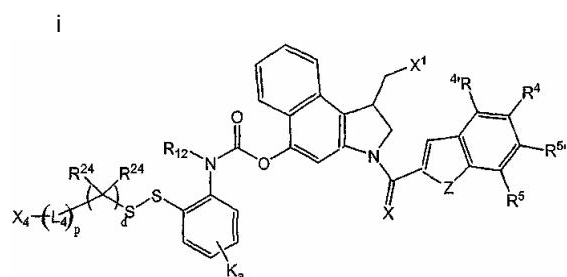
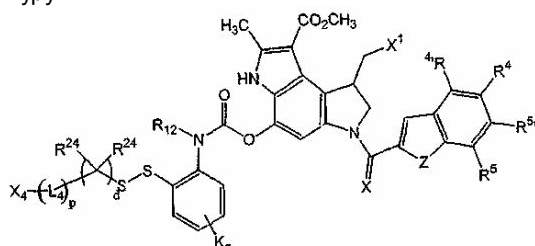
де PEG означає поліетиленглікольний фрагмент і X^1 означає Cl або Br. Ще в інших переважних варіантах винахід стосується кон'югату з гідразинним лінкером, вибраного з наступних структур:



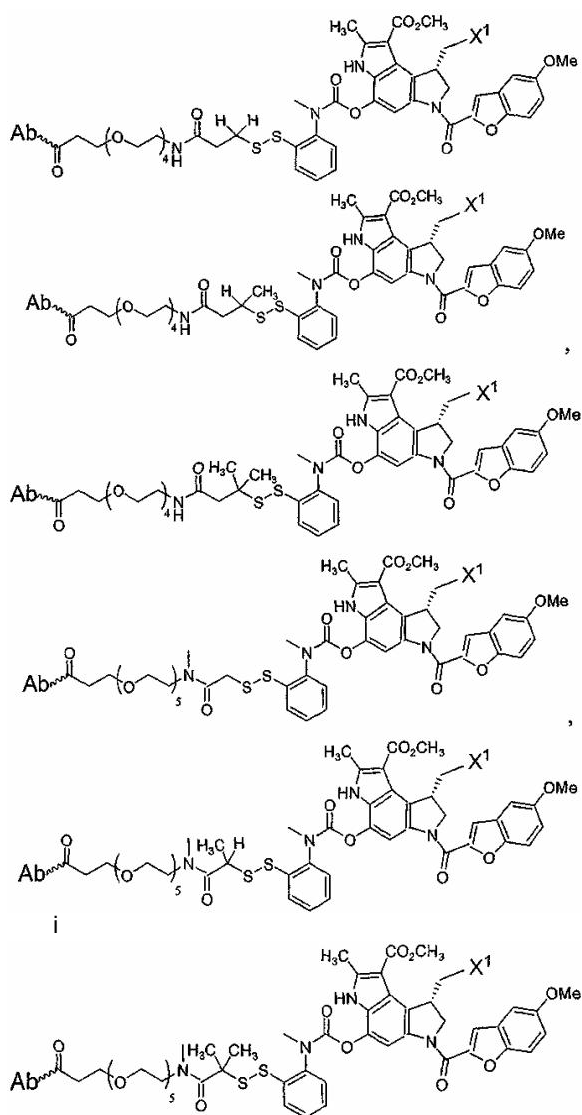
де X^1 означає Cl або Br і Ab означає антитіло або його фрагмент. В іншому переважному варіанті є кон'югат з гідразиним лінкером, вибраний з наступних структур:



С. Кон'югати з дисульфідними лшкерами
У переважному варіанті винахід стосується кон'югату з дисульфідним лінкером, що має структуру:



Необмежувальні приклади таких структур включають наступні:

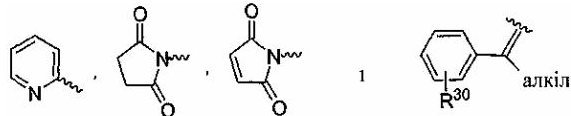


де X^1 означає Cl або Br і Ab означає антитіло або його фрагмент.

Ліганди

Ліганди даного винаходу зображені як " X^4 ". В даному винаході X^4 являє собою елемент, вибраний з групи, яка включає захищені реакційноздатні функціональні групи, захищені реакційноздатні функціональні групи, мітки, що детектуються, і направляючі агенти. Переважними лігандами є направляючі агенти, такі як антитіла і їх фрагменти.

У переважному варіанті групу X^4 можна описати як елемент, вибраний з R^{29} , $COOR^{29}$, $C(O)NR^{29}$ і $C(O)NNR^{29}$, де R^{29} являє собою компонент, вибраний із заміщеного або незаміщеного алкілу, заміщеного або незаміщеного гетероалкілу і заміщеного або незаміщеного гетероарилу. Ще в іншому типовому варіанті R являє собою компонент, вибраний з H, OH, $NHNH_2$,



де R^{30} являє собою заміщений або незаміщений алкіл, що має термінальну реакційноздатну

функціональну групу, заміщений або незаміщений гетероарил, що має термінальну функціональну групу. Наведені вище структури діють як реакційноздатні захисні групи, які можуть взаємодіяти, наприклад, з бічним ланцюгом амінокислоти направляючого агента, такого як антитіло, зв'язуючи тим самим направляючий агент з фрагментом лінкер-ліки.

Направляючі агенти

Лінкерні групи і цитотоксини даного винаходу можуть бути пов'язані з направляючими агентами, які селективно доставляють корисне навантаження в клітину, орган або ділянку організму. Типові направляючі агенти, такі як антитіла (наприклад, химерне, олюдне антитіло і антитіло людини), ліганди для рецепторів, лектини, сахариди, антитіла і подібні, визнані в даній галузі і застосовні без обмеження в практиці даного винаходу. Інші направляючі агенти включають клас сполук, які не включають специфічні молекулярні мотиви розпізнавання, включають макромолекули, такі як полі(етиленгліколь), полісахарид, поліамінокислоти і подібні, які додають цитотоксину молекулярну масу. Додаткова молекулярна маса впливає на фармакокінетику цитотоксину, наприклад, період напіврозпаду в сироватці.

У типовому варіанті винахід стосується цитотоксину, лінкера або кон'югату цитотоксин-лінкер з направляючим агентом, який являє собою біомолекулу, наприклад, антитіло, рецептор, пептид, лектин, сахарид, нуклеїнову кислоту або їх комбінацію. Технологічні маршрути одержання типових кон'югатів за даним винаходом викладені в наведених вище схемах.

Біомолекули, придатні для застосування на практиці даного винаходу, можна одержати з будь-якого джерела. Біомолекули можна виділити з природних джерел або можна одержати синтетичними способами. Білки можуть бути природними або мутуваними білками. Мутації можна виконати за допомогою хімічного мутагенезу, сайт-специфічного мутагенезу або іншими способами індуктування мутацій, відомими фахівцям в даній галузі. Білки, придатні для застосування даного винаходу на практиці, включають, наприклад, ферменти, антигени, антитіла і рецептори. Антитіла можуть бути або поліклональними, або моноклональними, але найбільш переважні моноклональні антитіла. Пептиди і нуклеїнові кислоти можуть бути виділені з природних джерел або можуть бути повністю або частково синтетичними за природою.

У переважному варіанті направляючий агент являє собою антитіло або фрагмент антитіла, який вибраний на основі його специфічності відносно антигену, який експресується в клітині-мішені або в наміченому цікавлячому місці. Ідентифікована широка різноманітність антигенів, пухлина-специфічних або специфічних відносно інших захворювань, і антитіла до цих антигенів використовуються або запропоновані до використання при терапії таких пухлин або інших захворювань. Антитіла, які відомі в даній галузі, можна використати в кон'югатах за даним винаходом, зокрема, для терапії захворювання, з яким пов'язаний антиген-мішень. Необмежувальні приклади антигенів-

мішеней (і пов'язаних з ними захворювань), на які може бути націлений кон'югат антитіло-лінкер-ліки за даним винаходом, включають: Her2 (рак молочної залози), CD20 (лімфоми), EGFR (солідні пухлини), CD22 (лімфоми, включаючи неходжкінську лімфому), CD52 (хронічний лімфоцитарний лейкоз), CD33 (гострий мієлогенний лейкоз), CD4 (лімфоми, аутоімунні захворювання, включаючи ревматоїдний артрит), CD30 (лімфоми, включаючи неходжкінську лімфому), Muc18 (меланома), інтегрини (солідні пухлини), PSMA (рак передміхурової залози, аденокарцинома передміхурової залози), CEA (колоноректальний рак), CD11a 5 (псоріаз), CD80 (псоріаз), CD23 (астма), CD40L (імунна тромбоцитопенічна пурпура), CTLA4 (Т-клітинні лімфоми) і BLys (аутоімунні захворювання, включаючи системний червоний вовчак).

У тих варіантах, де розпізнаваний фрагмент являє собою білок або антитіло, білок може бути прив'язаний до поверхні або компонента з самоасоційованим моношаром (SAM) або з'єднаний через спейсерну групу з будь-яким доступним реакційноздатним пептидним залишком на поверхні білка. У переважних варіантах реакційноздатні групи являють собою аміни або карбоксилати. В особливо переважних варіантах реакційноздатні групи являють собою ϵ -аміногрупи лізинових залишків. Крім того, дані молекули можуть адсорбуватись на поверхні субстрату або SAM за допомогою неспецифічних взаємодій (наприклад, хемосорбції, фізичної адсорбції).

Розпізнавані фрагменти, які є антитілами, можна використати для розпізнавання речовин, що аналізуються, які являють собою білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, сахариди або такі малі молекули, як ліки, гербіциди, пестициди, промислові хімічні речовини і військові агенти. Способи одержання антитіл для специфічних молекул добре відомі фахівцям в даній галузі. Дивись патенти [США №5/147786 (Feng та інш.) від 15 вересня 1992 року; No.5/334528 (Stanker та інш.) від 2 серпня 1994 року; No.5/686237 (Al-Bayati, M.A.S.) від 11 листопада 1997 року і No.5/573922 (Hoess та інш.) від 12 листопада 1996 року]. Способи приєднання антитіл до поверхонь також відомі в даній галузі. Дивись роботу [Delamarche та інш., *Langmuir* 12: 1944-1946 (1996)].

Направляючі агенти можна приєднати до лінкерів даного винаходу за допомогою наявних реакційноздатних груп. Наприклад, пептиди можна приєднати через амінну, карбоксильну, сульфгідрильну або гідроксильну групу. Така група може знаходитись на кінці пептиду або на внутрішньому сайті пептидного ланцюга. Нуклеїнові кислоти можна приєднати за допомогою реакційноздатної групи на основі (наприклад, екзоциклічний амін) або наявної гідроксильної групи на фрагменті цукру (наприклад, 3'- або 5'-гідроксил). Пептидні ланцюги або ланцюги нуклеїнових кислот можна додатково обробити з одержанням похідного за одним або декількома сайтами, дозволяючи приєднання до ланцюга відповідних реакційноздатних груп. Дивись роботу [Chrisey та інш., *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996)].

Якщо пептид або нуклеїнова кислота являє собою повністю або частково синтетичну молекулу, то реакційноздатну групу або масковану реакційноздатну групу можна включити в процесі синтезу. Фахівцям в даній галузі відомі багато які похідні мономери, відповідні для включення реакційноздатної групи в пептиди і нуклеїнові кислоти. Дивись, наприклад, [The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol.2: "Special Methods in Peptide Synthesis" Gross, E. and Melenhofer, J., Eds., Academic Press, New York (1980)]. Барато які придатні мономери доступні комерційно (Bachem, Sigma та інш.). Після синтезу можна видалити захист з маскованої групи, тоді вона стає доступною для взаємодії з компонентом сполуки даного винаходу.

Типові направляючі агенти на основі нуклеїнових кислот включають аптамери, антисмислові сполуки і нуклеїнові кислоти, які утворюють потрійні спіралі. Як необхідну хімічну функціональність для зв'язку направляючого агента на основі нуклеотиду з цитотоксином звичайно використовують гідроксильну групу від цукрового залишку, аміногрупу від основного залишку або фосфатний кисень від нуклеотиду. Однак фахівець в даній галузі легко зрозуміє, що до нуклеїнової кислоти можна підвісити інші "неприродні" реакційноздатні функціональності, застосовуючи загальновідомі методики. Наприклад, гідроксильну групу цукрового залишку можна перетворити в меркапто- або аміногрупу, застосовуючи методики, добре відомі в даній галузі.

Аптамери (або антитіла до нуклеїнових кислот) являють собою молекули одно- або дwonиткової ДНК або одnonиткової РНК, які зв'язують конкретні молекулярні мішені. Звичайно аптамери діють, інгібуючи дію молекулярних мішеней, наприклад, білків, за допомогою зв'язування сукупності мішеней, циркулюючих в крові. Аптамери володіють хімічною функціональністю і, таким чином, можуть ковалентно зв'язуватись з цитотоксинами, які тут описані.

Хоча дуже різноманітні молекулярні мішені здатні утворювати нековалентні, але специфічні асоціації з аптамерами, включаючи ліки у вигляді малих молекул, метаболіти, кофактори, токсини, ліки на основі сахаридів, ліки на основі нуклеотидів, глікопротеїни і подібні, звичайно молекулярна мішень містить білок або пептид, включаючи білки сироватки, кініни, ейкозаноїди, клітинні поверхневі молекули і подібні. Приклади аптамерів включають антитромбіновий інгібітор від Gilead GS 522 і його похідні (Gilead Science, Foster City, Calif.). Дивись також роботи [Macaya та інш., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3745-9 (1993); Bock та інш., *Nature* (London) 355: 564-566 (1992) і Wang та інш., *Biochem.* 32: 1899-904 (1993)].

Аптамери, специфічні відносно даної біомолекули, можна ідентифікувати, застосовуючи відомі в даній галузі методики. Дивись, наприклад, [Toole та інш. (1992) PCT-публікація №WO 92/14843; Tuerk and Gold (1991) PCT-публікація №WO 91/19813; Weintraub and Hutchinson (1992) PCT-публікація №92/05285 і Ellington and Szostak, *Nature* 346: 818 (1990)]. Стисло кажучи, дані мето-

дики звичайно включають комплексоутворення молекулярних мішеней з випадковою сумішшю олігонуклеотидів. Комплекс аптамер-молекулярна мішень відділяють від незакомплексованих олігонуклеотидів. Аптамер відновлюють з відділеного комплексу і ампліфікують. Цей цикл повторюють для ідентифікації послідовностей аптамерів з найбільшою спорідненістю відносно даних молекулярних мішеней.

Для захворювань, що є результатом недоречної експресії генів, ідеальною терапією є специфічне запобігання або зниження експресії таких генів. В принципі, можна інгібувати, знижувати або відключити виробництво конкретного генного продукту за допомогою гібридизації одноланцюгового дезоксинуклеотиду або рибозедезоксинуклеотиду, комплементарного доступній послідовності в мРНК, або послідовності в транскрипті, яка суттєва для обробки пре-мРНК, або послідовності в самому гені. Даний приклад генетичного регулювання часто називають антисмисловим або антигенним інгібуванням. Додаткову ефективність надають за допомогою кон'югації з нуклеїновою кислотою алкілюючого агента, такого як агент даного винаходу.

Антисмислові сполуки являють собою нуклеїнові кислоти, призначені для зв'язування і позбавлення можливості або запобігання одержанню мРНК, відповідальної за генерацію конкретного білка. Антисмислові сполуки включають антисмислові РНК або ДНК, одно або двониткові, олігонуклеотиди або їх аналоги, які можуть гібридизуватись специфічно відносно індивідуального виду мРНК і запобігати транскрипції і/або РНК-обробці даного виду мРНК і/або трансляції кодованого поліпептиду і знижувати тим самим кількість відповідного кодованого поліпептиду. [Ching та інш., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10006-10010 (1989); Broder та інш., *Ann. Int. Med.* 113: 604-618 (1990); Loreau та інш., *FEBS Letters* 274: 53-56 (1990); Holcenberg та інш., WO 91/11535; WO 91/09865; WO 91/04753; WO 90/13641; WO 91/13080, WO 91/06629 і EP 386563]. Завдяки своїй найкращій цільовій чутливості і селективності, антисмислові олігонуклеотиди придатні для доставки терапевтичних агентів, таких як цитотоксини даного винаходу, до необхідної молекулярної мішені.

Інші повідомляють, що нуклеїнові кислоти можуть зв'язуватись з подвійною ДНК за допомогою утворення потрійної спіралі та інгібувати транскрипцію і/або синтез ДНК. Сполуки з потрійними спіралями (що також позначаються як трьохниткові ліки), являють собою олігонуклеотиди, які зв'язуються з послідовностями двониткової ДНК і, як передбачається, селективно інгібують транскрипцію генів, що спричиняють захворювання, такі як вірусні гени, наприклад, ВІЛ і вірус *herpes simplex*, і онкогени, а саме, вони зупиняють виробництво білка в клітинному ядрі. Дані ліки приєднуються безпосередньо до двониткової ДНК в клітинному геномі, утворюючи потрійну спіраль і запобігаючи виробництву клітиною цільового білка. Дивись, наприклад, [PCT публікації №WO 92/10590, WO 92/09705, WO 91/06626 і патент США №5176996]. Таким чином, цитотоксини даного винаходу також

кон'югують з послідовностями нуклеїнових кислот, які утворюють потрійні спіралі.

На сайт-специфічність нуклеїнових кислот (наприклад, антисмислових сполук і триспіральних ліків) несуттєво впливає модифікація фосфодієфірного зв'язку або хімічна модифікація олігонуклеотидного кінця. Отже, дані нуклеїнові кислоти можна хімічно модифікувати, підвищуючи загальну стабільність зв'язування, підвищуючи стабільність в значенні хімічного розкладання, підвищуючи швидкість, з якою олігонуклеотиди транспортуються в клітини, і надаючи молекулам хімічну реакційну здатність. Загальний підхід до конструювання різних нуклеїнових кислот, придатних при антисмисловій терапії, розглядається в роботах [van der Krol та інш., *Biotechniques* 6: 958-976 (1988) і Stein та інш., *Cancer Res.* 48: 2659-2668 (1988)]. Отже, в типовому варіанті, цитотоксини даного винаходу кон'югують з нуклеїновою кислотою при модифікації фосфодієфірного зв'язку.

Крім того, аптамери, антисмислові сполуки і триспіральні ліки, які несуть цитотоксини даного винаходу, можуть також включати нуклеотидні заміщення, додавання, знищення або переміщення, доти, доки зберігається специфічна гібридизація або асоціація з відповідною цільовою послідовністю як функціональна властивість олігонуклеотиду. Наприклад, деякі варіанти використовують фосфоротіоатні аналоги, які більш стійкі до розкладання нуклеазами, ніж їх природні фосфатні дієфірні копії і, отже, як очікується, мають більш високу стійкість *in vivo* і велику ефективність [дивись, наприклад, Campbell та інш., *J. Biochem. Biophys. Methods* 20: 259-267 (1990)]. Також відомо, що фосфороамідатні похідні олігонуклеотидів зв'язуються з комплементарними полінуклеотидами і володіють додатковою здатністю акомодувати ковалентно приєднаний вид ліганду і будуть відповідати способам даного винаходу. Дивись, наприклад, [Froehler та інш., *Nucleic Acids Res.* 16(11): 4831 (1988)].

У деяких варіантах аптамери, антисмислові сполуки і триспіральні ліки містять О-метилрибонуклеотиди [EP публікація №360609]. Можна також використати химерні олігонуклеотиди [Dagle та інш., *Nucleic Acids Res.* 18: 4751 (1990)]. Для деяких застосувань антисмислові олігонуклеотиди і потрійні спіралі можуть містити поліаміднуклеїнові кислоти [Nielsen та інш., *Science* 254: 1497 (1991) і PCT-публікація №WO 90/15065] або інші катіонні похідні [Letsinger та інш., *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470-4471 (1988)]. Інші застосування можуть використати олігонуклеотиди, де одна або декілька з фосфодієфірних зв'язків є заміщеними ізостеричною групою, такою як міжнуклеозидний зв'язок довжиною в 2-4 атоми, яка описано в [PCT-публікаціях №WO 92/05186 і 91/06556], або формацетальна група [Matteucci та інш., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7767-7768 (1991)], або амідна група [Nielsen та інш., *Science* 254: 1497-1500 (1991)].

Крім того, в даному винаході можна використати нуклеотидні аналоги, наприклад, ті, в яких цукор або основа хімічно модифіковані. "Аналогічними" формами пуринів і піримідинів є форми,

звичайно відомі в даній галузі, багато які з яких використовують як хіміотерапевтичні агенти. Типовий, але не вичерпний список включає 4-ацетилцитозин, 5-карбоксигідроксиметил-урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламінометил-2-тіоурацил, 5-карбоксиметиламінометилурацил, дигідроурацил, інозин, N⁶-ізопентиніладенін, 1-метиладенін, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанін, 1-метилінозин, 2,2-диметилгуанін, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁶-метиладенін, 7-метилгуанін, 5-метиламінометилурацил, 5-метоксіамінометил-2-тіоурацил, β-D-манозилкуеозин, 5'-метоксикарбонілметилурацил, 5-метоксіурацил, 2-метилтіо-N⁶-ізопентиніладенін, метиловий ефір урацил-5-оксіоцтової кислоти, урацил-5-оксіоцтова кислота (v), вібутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, 5-метил-2-тіоурацил, 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 5-метилурацил, метиловий ефір N-урацил-5-оксіоцтової кислоти, і 2,6-діамінопурин. Крім загальновідомих основ використовують галогеновані основи. Крім того, положення 2'-фуранози на основі може мати заміщення незарядженою об'ємною групою. Приклади незаряджених об'ємних груп включають розгалужені алкіли, цукри і розгалужені цукри.

Термінальна модифікація також забезпечує придатну методику для кон'югації цитотоксинів з нуклеїновою кислотою, модифікації специфічності клітинного типу, фармакокінетики, ядерної проникності і абсолютної швидкості клітинного поглинання для олігонуклеотидних фармацевтичних агентів. Наприклад, відомий порядок заміщень по 5' і 3' кінцям для включення реакційноздатних груп, який допускає ковалентне приєднання цитотоксинів. Дивись, наприклад, роботи [Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, (1989) Cohen, Ed., CRC Press; Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapeutic for Cancer and AIDS (1991), Wickstrom, Ed., Wiley-Liss; Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA (1992) Erickson and Izant, Eds., Raven Press; і Antisense RNA і DNA (1992), Murray, Ed., Wiley-Liss. Загальні способи, що стосуються антисмислових сполук, дивись в роботі Antisense RNA and DNA (1988), D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.].

Мітки, що детектуються

Особлива мітка або група, що детектується, яка використовується в поєднанні зі сполуками і способами за даним винаходом, звичайно не є критичним аспектом винаходу, доти, доки вона суттєво не впливає на активність або застосовність сполуки даного винаходу. Групою, що детектується, може бути будь-який матеріал, що володіє фізичною або хімічною властивістю, що детектується. Такі мітки, що детектуються, ґрунтовно розроблені в галузі імунодосліджень і, взагалі, більшість міток, придатних у таких способах, може застосовуватись в даному винаході. Таким чином, мітка являє собою будь-яку композицію, яка детектується спектроскопічними, фотохімічними, біохімічними, імунохімічними, електричними, оптичними або хімічними способами. Придатні мітки в

даному винаході включають магнітні гранули (наприклад, DYNABEADSTM), флуоресцентні барвники (наприклад, флуоресцеїнізотіоціанат, Texas red, родамін і подібні), радіомітки (наприклад, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C або ³²P), ферменти (наприклад, пероксидазу хрому, лужну фосфатазу та інші, що звичайно використовуються в ELISA) і колориметричні мітки, такі як колоїдне золото або забарвлені скляні або пластикові гранули (наприклад, полістирол, поліпропілен, латекс та інш.).

Мітка може бути пов'язана безпосередньо або не безпосередньо зі сполукою даного винаходу згідно зі способами, добре відомими в даній галузі. Як показано вище, можна використати широке різноманіття міток, вибираючи мітку в залежності від необхідної чутливості, простоти кон'югації зі сполукою, вимог стабільності, наявної апаратури і забезпечення її видалення.

Якщо сполука даного винаходу являє собою кон'югат з міткою, що детектується, то дана мітка переважно є елементом, вибраним з групи, яка включає радіоактивні ізотопи, флуоресцентні агенти, попередники флуоресцентних агентів, хромофори, ферменти і їх комбінації. Способи кон'югації різних груп з антитілами добре відомі в даній галузі. Наприклад, мітка, що детектується, яку часто кон'югують з антитілом, являє собою фермент, такий як пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, β-галактозидаза і глюкозооксидаза.

Нерадіоактивні мітки часто приєднують посередніми способами. Звичайно молекулу ліганду (наприклад, біотину) ковалентно зв'язують з компонентом кон'югату. Потім приєднують ліганд до іншої молекули (наприклад, стрептавідину), яка або по суті є такою, що детектується, або ковалентно пов'язана з сигнальною системою, наприклад, з ферментом, що детектується, флуоресцентною сполукою або хемілюмінесцентною сполукою.

Компоненти кон'югатів за даним винаходом також можуть бути безпосередньо кон'юговані зі сполуками, що генерують сигнал, наприклад, при кон'югації з ферментом або флуорофором. Ферменти, що представляють інтерес як мітка, являють собою, головним чином, гідролази, особливо фосфатази, естерази і глікозидази, або оксидатази, особливо пероксидази. Флуоресцентні сполуки включають флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, данзил, умбеліферон та інш. Хемілюмінесцентні сполуки включають люциферин і 2,3-дигідрофалазиндіони, наприклад, люмінол. Огляд різних міток або сигнал-продукуючих систем, які можна використати, дивись в [патенті США №4391904].

Способи детектування міток добре відомі фахівцям в даній галузі. Таким чином, якщо мітка являє собою, наприклад, радіоактивну мітку, засоби детектування включають сцинтиляційний лічильник або фотографічну плівку як в авторадіографії. Якщо мітки являють собою флуоресцентну мітку, то її можна детектувати, збуджуючи флуорохром при відповідній довжині хвилі світла і детектуючи одержану флуоресценцію. Можна детектувати флуоресценцію візуально, за допомогою фотографічної плівки, використовуючи електронні детектори, такі як прилади із зарядовим зв'язком

(ПЗЗ) або фотопомножувачі і подібні. Аналогічно, ферментативні мітки можна детектувати, забезпечуючи відповідні субстратами для ферменту і детектуючи продукт реакції, що одержується. На закінчення, прості колориметричні мітки можна детектувати, просто спостерігаючи колір, асоційований з даною міткою. Таким чином, в різних дослідженнях за індикаторами кон'юговане золото часто виглядає рожевим, тоді як різні кон'юговані гранули мають колір даних гранул.

У цей час переважні флуоресцентні мітки, оскільки вони мають перевагу, не вимагаючи великих обережностей при роботі і будучи придатними для високопродуктивних візуальних методик (оптичний аналіз, що включає перетворення в цифрову форму зображення для аналізу в інтегрованій системі, що включає комп'ютер). Переважні мітки звичайно характеризуються одним або декількома з наступних факторів: високою чутливістю, високою стабільністю, слабким фоном, низькою чутливістю до оточення і високою специфічністю при введенні мітки. Багато які флуоресцентні мітки доступні комерційно від хімічної компанії SIGMA (Saint Louis, MO), Molecular Probes (Eugene, OR), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem. Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) і Applied Biosystems (Foster City, CA), а також багатьох інших комерційних джерел, відомих фахівцям. Крім того, фахівець в даній галузі визначить, як вибрати відповідний флуорофор для конкретного застосування, і, якщо він не є легко доступним комерційно, фахівець здатний синтезувати необхідний флуорофор заново або синтетично модифікувати комерційно доступні флуоресцентні сполуки, щоб одержати необхідну флуоресцентну мітку.

Крім того, в даному винаході придатні флуорофори у вигляді малих молекул, природні флуоресцентні білки і сконструйовані аналоги таких білків. Такі білки включають, наприклад, зелені флуоресцентні білки з *cnidarians* [Ward та інш., *Photochem. Photobiol.* 35: 803-808 (1982); Levine та інш., *Сотр. Biochem, Physiol*, 72B: 77-85 (1982)], жовтий флуоресцентний білок з штаму *Vibrio fischeri* [Baldwin та інш., *Biochemistry* 29: 5509-15 (1990)], перидинін-хлорофіл з *dinoflagellate Symbiodinium* sp. [Morris та інш., *Plant Molecular Biology* 24: 673:77 (1994)], фікобіліпротеїни з морських синьо-зелених водоростей, таких як *Synechococcus*, наприклад, фікоеритрин і фікоціанін [Wilbanks та інш., *J. Biol Chem.* 268: 1226-35 (1993)] і подібні.

Звичайно перед утворенням зв'язку між цитотоксином і направляючим (або іншим) агентом і необов'язково спейсерною групою активують щонайменше одну з хімічних функціональностей. Фахівець в даній галузі розуміє, що різноманітна хімічна функціональність, що включає гідрокси, аміно і карбоксигрупи, можна активувати, використовуючи різноманітні стандартні способи і умови. Наприклад, гідроксильну групу цитотоксину або

направляючого агента можна активувати за допомогою обробки фосгеном, одержуючи відповідний хлороформіат, або пара-нітрофенілхлорформіатом, одержуючи відповідний карбонат.

У типовому варіанті винахід використовує направляючий агент, який включає карбоксильну функціональність. Карбоксильну групу можна активувати, наприклад, за допомогою конверсії у відповідний ацилгалогенід або активний складний ефір. Дану реакцію можна проводити в різних умовах, як показано в наведеній вище роботі March, pp.388-89. В типовому варіанті ацилгалогенід одержують за допомогою взаємодії карбоксильмісної групи з оксалілхлоридом. Проводять взаємодію активованого агента з цитотоксином або комбінацією цитотоксин-лінкерна група, одержуючи кон'югат з даним винаходом. Фахівець в даній галузі оцінить, що використання карбоксильмісних направляючих агентів є тільки ілюстративним, і що агенти, які мають багато які інші функціональні групи, можна кон'югувати з лінкерами за даним винаходом.

Реакційноздатні функціональні групи

Для простоти ілюстрації подальше обговорення фокусується на кон'югації цитотоксину даного винаходу з направляючим агентом. Центром обговорення є приклад одного варіанту за даним винаходом, з якого фахівець в даній галузі легко зробить висновки про інші варіанти. Фокусуючи обговорення на одному варіанті, не мають на увазі ніяких обмежень даного винаходу.

Типові сполуки даного винаходу несуть реакційноздатну функціональну групу, яка звичайно розташована на заміщеному або незаміщеному алкільному або гетероалкільному ланцюзі, полегшуючи її приєднання до іншого типу. Звичайним розташуванням для реакційноздатної групи є термінальне положення на ланцюгу.

Реакційноздатними групами і класами реакцій, придатними для застосування на практиці даного винаходу, звичайно є ті, які добре відомі в даній галузі хімії біокон'югатів. Реакційноздатна функціональна група може бути захищеною або незахищеною, і захищену природу групи можна змінити способами, відомими в даній галузі органічного синтезу. У наш час переважними класами доступних реакцій з реакційноздатними аналогами цитотоксинів є класи реакцій, які протікають у відносно м'яких умовах. Вони включають, але не обмежені цим, нуклеофільні заміщення (наприклад, взаємодії амінів і спиртів з ацилгалогенідами, активними складними ефірами), електрофільні заміщення (наприклад, реакції енамінів) і приєднання до кратних зв'язків вуглець-вуглець і вуглець-гетероатом (наприклад, реакція Міхаеля, приєднання по Дільсу-Альдеру). Дані та інші відповідні реакції обговорюються, наприклад, [в роботі March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; і Feeney та інш., *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol.198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982].

Характерні типи реакцій включають взаємодію карбоксильних груп і різних їх похідних, включаю-

чи, але не обмежуючись цим, N-гідроксисукцинімідні складні ефіри, N-гідроксибензтриазольні складні ефіри, галогенангідриди кислот, ацилімідазоли, складні тіоефіри, пара-нітрофенільні складні ефіри, алкільні, алкенільні, алкінільш і ароматичні складні ефіри. Гідроксильні групи можна перетворити в складні ефіри, прості ефіри, альдегіди та інш. Галогеналкільні групи перетворюють в новий тип при взаємодії, наприклад, з аміном, карбоксилат-аніоном, тіоловим аніоном, карбаніоном або алкоксид-іоном. Дієнофільні (наприклад, малеїмідна) групи беруть участь в реакції Дільса-Альдера. Альдегідні або кетонні групи можна перетворити в іміни, гідразони, семікарбазони або оксими, або застосовуючи такі способи як приєднання по Гріньяру або приєднання алкіллітію. Сульфонілгалогеніди легко взаємодіють з амінами, утворюючи, наприклад, сульфонаміди. Наприклад, амінні або сульфгідрильні групи ацилюють, алкілюють або окислюють. Алкени можна перетворити в ряд нових видів, застосовуючи циклоприєднання, ацилювання, приєднання по Міхаєлю та інш. Епоксиди легко взаємодіють з амінами і гідроксильними сполуками.

Фахівець в даній галузі легко зрозуміє, що багато які з цих зв'язків можна одержати різноманітними способами і застосовуючи різноманітні умови. Одержання складних ефірів, дивись, наприклад, в наведеній вище роботі [March, стор.1157]; складних тіоефірів - в наведеній вище роботі [March, стор.362-363, 491, 720-722, 829, 941 і 1172]; карбонатів - в наведеній вище роботі [March, стор.346-347]; карбаматів - в наведеній вище роботі [March, стор.1156-57]; амідів - в наведеній вище роботі [March, стор.1152]; карбамідів і тіокарбамідів - в наведеній вище роботі [March, стор.1174]; одержання ацеталей і кеталей дивись в наведеній вище роботі [Green та інш., стор.178-210] і наведеній вище роботі [March, стор.1146]; одержання ацилоксалкільних похідних дивись в [Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1992]; одержання складних ефірів енолів дивись в наведеній вище роботі [March, стор.1160]; N-сульфонілімідатів дивись в роботі [Bundgaard та інш., J. Med. Chem., 31: 2066 (1988)]; ангідридів - в наведеній вище роботі [March, стор.355-56, 636-37, 990-91 і 1154]; N-ациламідів - в наведеній вище роботі [March, стор.379]; N-основ Манніха - в наведеній вище роботі [March, стор.800-02 і 828]; одержання складних ефірів гідроксиметилкетонів дивись в роботі [Petracek та інш., Annals NY Acad. Sci., 507: 353-54 (1987)]; дисульфідів - в наведеній вище роботі [March, стор.1160] і фосфонатних складних ефірів і фосфонамідатів.

Реакційноздатні функціональні групи можуть бути незахищеними і вибрані таким чином, що не беруть участь у взаємодіях або не впливають на них. По-іншому, реакційноздатні функціональні групи можуть бути захищені від участі у взаємодії, завдяки присутності захисної групи. Фахівець в даній галузі розуміє, як захистити конкретну функціональну групу від впливу вибраного набору умов реакції. Приклади придатних захисних груп дивись в роботі [Greene та інш., Protective Groups in

Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991].

Звичайно направляючий агент ковалентно приєднують до цитотоксину, завдяки їх відповідним хімічним функціональностям, використовуючи стандартні хімічні методики. Необов'язково, лінкер або агент приєднують до агента через одну або більше спейсерних груп. Спейсерні групи можуть бути еквівалентними або різними, якщо використовуються в комбінації.

Звичайно перед утворенням зв'язку між цитотоксином і реакційноздатною функціональною групою і необов'язково спейсерною групою щонайменше одну з хімічних функціональностей активують. Фахівець в даній галузі оцінить, що різноманітні хімічні функціональності, включаючи гідрокси, аміно і карбоксигрупи, можна активувати, застосовуючи різноманітні стандартні способи і умови. У типовому варіанті винахід містить карбоксильну функціональність як реакційноздатну функціональну групу. Карбоксильні групи можна активувати, як описано тут вище.

Фармацевтичні препарати і способи введення

В іншому переважному варіанті даний винахід стосується фармацевтичного препарату, що включає сполуку даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій. Описані тут сполуки, включаючи фармацевтично прийнятні носії, такі як адитивні солі або їх гідрати, можна доставити пацієнту, використовуючи різноманітні методи або способи введення. Відповідні способи введення включають, але не обмежені цим, інгаляцію, трансдермальне, пероральне, ректальне введення, введення через слизову оболонку, кишкове і парентеральне введення, включаючи внутрішньом'язові, підшкірні і внутрішньовенні ін'єкції. Переважно вводити кон'югати даного винаходу, що включають антитіло або фрагмент антитіла як направляючий фрагмент, парентерально, більш переважно внутрішньовенно.

Передбачається, що терміни, що використовуються тут, "прийом" або "введення" охоплюють всі способи безпосередньої і не безпосередньої доставки сполуки до призначеного місця дії.

Описані тут сполуки або їх фармацевтично прийнятні солі і/або гідрати, можна вводити самі по собі, в комбінації з іншими сполуками даного винаходу і/або у вигляді коктейлю, об'єднавши з іншими терапевтичними агентами. Звичайно вибір терапевтичних агентів, які можна спільно вводити зі сполуками даного винаходу, частково залежить від умов обробки.

Наприклад, якщо сполуку вводять пацієнтам, страждаючим від хворобливого стану організму, який залежить від автостимулятора (автоіндуктора), то сполуки даного винаходу можна вводити у вигляді коктейлів, що містять агенти, які використовуються для лікування болю, інфекції та інших симптомів і побічних ефектів, звичайно пов'язаних з даним захворюванням. Такі агенти включають, наприклад, анальгетики, антибіотики та інш.

При введенні пацієнту, що проходить курс лікування раку, сполуки можна вводити у вигляді коктейлів, які містять протиракові агенти і/або додаткові агенти, що підвищують ефективність. Спо-

луки можна також вводити у вигляді коктейлів, що містять агенти, які придушують такі побічні ефекти радіаційної терапії, як протиблювотні агенти, захисні агенти від радіації та інш.

Додаткові агенти, що підвищують ефективність, які можна вводити спільно зі сполуками даного винаходу, включають, наприклад, трициклічні антидепресантні ліки (наприклад, іміпрамін, дезипрамін, амітриптилін, кломіпрамін, триміпрамін, доксерін, нортриптилін, протриптилін, амоксапін і мапротилін); нетрициклічні і антидепресантні ліки (наприклад, сертралін, тразодон і циталопрам); Ca^{+2} -антагоністи (наприклад, верапаміл, ніфедипін, нітредипін і кароверін); амфотерицин; аналози трипаранолу (наприклад, тамоксифен); ліки проти аритмії (наприклад, гуїнідин); антигіпертензивні ліки (наприклад, резерпін); агенти, що виводять тіол (наприклад, бутіонін і сульфохімін); і кальцій лейковорин.

Активні сполуки даного винаходу вводять самі по собі або у вигляді фармацевтичної композиції, де активна сполука (сполуки) знаходиться в суміші з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або розріджувачами. Фармацевтичні композиції для застосування згідно з даним винаходом звичайно складають загальновідомим способом, використовуючи один або більше фізіологічно прийнятних носіїв, що включають наповнювачі і допоміжні речовини, які полегшують обробку активних сполук до препаратів, які можна використати фармацевтично. Відповідний препарат залежить від вибраного способу введення.

Для введення через слизову оболонку в препараті використовують проникаючі агенти, придатні для подолання бар'єра. Такі проникаючі агенти звичайно відомі в даній галузі.

Для перорального введення сполуки можна легко приготувати, об'єднуючи активнеу сполуку (сполуки) з фармацевтично прийнятними носіями, добре відомими в даній галузі. Такі носії дають можливість готувати сполуки даного винаходу у вигляді таблеток, пілюль, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, паст, суспензій і подібного для перорального заковтування пацієнтом, що підлягає лікуванню. Для одержання фармацевтичних препаратів для перорального використання можна твердий наповнювач необов'язково перемолоти в результуючу суміш і, якщо потрібно, обробити дану суміш гранул після додавання придатних допоміжних агентів, одержуючи ядра таблеток або драже. Придатними наповнювачами є, зокрема, наповнювачі, такі як цукор, включаючи лактозу, сахарозу, маніт або сорбіт; целюлозні препарати, такі як, наприклад, кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль, картопляний крохмаль, желатин, трагакантова камедь, метилцелюлоза, гідроксипропілметил-целюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза і/або полівінілпіролідон (PVP). Якщо потрібно, можна додати розпушувачі, такі як зшитий полівінілпіролідон, агар або альгінова кислота або її сіль, наприклад, альгінат натрію.

Ядра драже забезпечують прийнятними покриттями. Для цієї мети можна використати конче-

нтровані цукрові розчини, які можуть необов'язково містити аравійську камедь, тальк, полівінілпіролідон, гель карбопол, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, розчини глазури і відповідні органічні розчинники або суміші розчинників. Можна додати до покриттів таблеток або драже фарбувальні речовини або піменти для ідентифікації або характеристики різних комбінацій доз активних сполук.

Фармацевтичні препарати, які можна використати перорально, включають набиті капсули з желатину, а також м'які, закупорені капсули з желатину і пластифікатора, такого як гліцерин або сорбіт. Набиті капсули можуть містити активні інгредієнти в суміші з наповнювачем, таким як лактоза, зв'язувальними, такими як крохмаль, лубрикантами, такими як тальк або стеарат магнію, і необов'язково стабілізаторами. У м'яких капсулах активні сполуки можуть бути розчинені або суспендовані у відповідних рідинах, таких як жирні олії, вазелінова олія або рідкі поліетиленгліколи. Крім того, можна додати стабілізатори. Всі препарати для перорального введення повинні бути в дозованому вигляді, придатному для такого введення.

Для букального введення композиції можуть мати вигляд таблеток або коржиків, приготованих загальновідомим способом.

Для введення за допомогою інгаляції сполуки для використання відповідно до даного винаходу звичайно доставляють у вигляді аерозольного спрею з упаковок під тиском або розпилювача із застосуванням відповідного пропеланту, наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду вуглецю або іншого відповідного газу. У випадку герметичного аерозолю дозувальну одиницю можна визначити, забезпечивши клапан, що доставляє відміряну кількість. Можна приготувати капсули і картриджі, наприклад, з желатину для використання в інгаляторі або інсуфляторі, що містять порошкову суміш сполуки і відповідної порошкової основи, такої як лактоза або крохмаль.

Сполуки можна приготувати для парентерального введення за допомогою ін'єкції, наприклад, болюсної ін'єкції або безперервного вливання. Ін'єкція є переважним методом введення для композицій даного винаходу. Препарати для ін'єкції можна представити, наприклад, в ампулах або в багатодозових контейнерах з додаванням консервантів. Композиції можуть бути у вигляді суспензій, розчинів або емульсій в масляних або водних носіях і можуть містити агенти, які сприяють одержанню препарату, такі як суспендуєчі, стабілізуючі і/або диспергуючі агенти, можна додати такі агенти як зшитий полівінілпіролідон, агар або альпнову кислоту або її солі, наприклад, альгінат натрію.

Фармацевтичні препарати для парентерального введення включають водні розчини активних сполук у водорозчинній формі. Крім того, суспензії активних сполук можна одержати у вигляді відповідних масляних суспензій для ін'єкцій. Відповідні ліпофільні розчинники або носії включають такі жирні олії, як кунжутна олія, або такі синтетичні жирнокислотні складні ефіри, як етилолеат або

тригліцериди, або ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії, наприклад, натрійкарбоксиметилцелюлозу, сорбіт або декстран. Необов'язково суспензія може також містити відповідні стабілізатори або агенти, що підвищують розчинність сполук, допускаючи приготування високо концентрованих розчинів. Для ін'єкцій агенти даного винаходу можна приготувати у водних розчинах, переважно в таких фізіологічно сумісних буферах, як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний буфер.

По-іншому, активний інгредієнт може бути у вигляді порошку для відновлення перед використанням за допомогою відповідного носія, наприклад, стерильної води, що не містить пірогенів.

Сполуки можна також приготувати у вигляді композицій для ректального введення, таких як супозиторії або утримувальні клізми, наприклад, що містять загальновідомі основи для супозиторіїв, такі як масло какао або інші гліцериди.

В доповнення до описаних раніше препаратів можна також приготувати сполуки у вигляді препарату тривалої дії. Такі препарати тривалої дії можна вводити за допомогою імплантації або доставляти через шкіру (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово), за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції або трансдермального пластиру. Таким чином, можна формулювати сполуки, наприклад, з придатними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятній олії) або іонообмінними смолами, або у вигляді слабо розчинних похідних, наприклад, слабо розчинних солей.

Фармацевтичні композиції також можуть містити відповідні тверді або гелеподібні носії або наповнювачі. Приклади таких носіїв або наповнювачів включають, але не обмежені цим, карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри, крохмалі, похідні целюлози, желатин і полімери, такі як поліетиленгліколи.

Переважаюча фармацевтична композиція являє собою композицію, приготувану для ін'єкції, наприклад, внутрішньовенної ін'єкції, і включає приблизно від 0,01 до 100% мас. кон'югату ліки-ліганд, приймаючи за 100% масу всієї фармацевтичної композиції. Кон'югат ліки-ліганд може являти собою кон'югат антитіло-цитотоксин, де антитіло вибрано таким чином, щоб бути націленим на конкретний рак.

Бібліотеки

В галузь даного винаходу входять також бібліотеки кон'югатів цитотоксинів цитотоксин-лінкер і агент-лінкер для цитотоксинів і лінкерів даного винаходу. Типові бібліотеки включають щонайменше 10 сполук, більш переважно щонайменше 100 сполук, ще більш переважно щонайменше 1000 сполук і ще більш переважно щонайменше 100000 сполук.

Бібліотеки існують в такому вигляді, що легко робити запит по конкретній властивості, наприклад, цитотоксичності, розкладанню лінкера ферментом або іншим реагентом розкладання. Типові форми включають формати чипів, мікромасиви і подібні.

Паралельний або комбінаторний синтез має своєю головною метою утворення бібліотеки різних молекул, які всі володіють загальною відмінною ознакою, позначеною в даному описі як каркас. При заміні різних компонентів в кожній з частин каркасної молекули, що змінюються, росте кількість простору, що досліджується, в бібліотеці. Теорії і сучасна медична хімія підтримують концепцію зайнятого простору як ключового фактора у визначенні ефективності даної сполуки проти даної біологічної мішені. При створенні різноманітної бібліотеки молекул, яка розглядає велику частку цільового простору, значно зростає випадковість розвитку високо ефективної початкової сполуки.

Паралельний синтез звичайно проводять на твердофазному носії, такому як полімерна смола. Каркас або інший відповідний проміжний продукт прив'язують до смоли хімічним лінкером з можливістю відщеплення. Поки каркас прив'язаний до частинки, проводять реакції для його модифікації.

Варіації реагентів і/або умов реакції дають структурне різноманіття, яке є критерієм кожної бібліотеки.

Спроби проведення паралельного синтезу "малих" молекул (неолігомерів з молекулярною масою 200-1000) були рідкими до 1990. Дивись, наприклад, роботу [Camps та інш., *Annals de Chimie*, 70: 848 (1990)]. Недавно Ellman розкрив паралельний синтез на твердофазному носії (також названий "комбінаторним") одинадцять аналогів бензодіазепіну поряд з деякими простагландинами і бета-поворотними міметиками. Дані розкриття наведені як приклади в [патенті США №5288514]. Інше відповідне розкриття паралельного синтезу малих молекул можна знайти в [патенті США №5324483]. Даний патент розкриває паралельний синтез 4-40 сполук в кожному з шістнадцяти різних каркасів. Chen та інш. також застосували стратегії органічного синтезу для розробки непептидних бібліотек, синтезованих з використанням багатостадійних процесів на полімерному носії. [Chen та інш., *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 2661-2662 (1994)].

Одержавши бібліотеку унікальних сполук, можна одержати бібліотеку імункон'югатів або антитіл, використовуючи як вищезгадану точку бібліотеку автостимуляторів і описані тут способи.

Набори

Інший аспект даного винаходу стосується наборів, що містять одну або більше сполук або композицій за даним винаходом і вказівку із застосування сполуки або композиції. У типовому варіанті винахід стосується набору для кон'югації лінкерної групи даного винаходу з іншою молекулою. Набір включає лінкер і вказівки з приєднання даного лінкера до конкретної функціональної групи. Набір може також включати одні або декілька з цитотоксичних ліків, направляючих агентів, міток, що детектуються, фармацевтичних солей або буферів. Набір може також включати контейнер і необов'язковий одну або більше пляшечок, тестових пробірок, склянок, пляшечок або шприців. Інші формати для наборів ясні фахівцям в даній галузі і входять в область даного винаходу.

Очищення

В іншому типовому варіанті даний винахід стосується способу виділення молекулярної мішені для сполуки ліганд-цитотоксин за даним винаходом, яка зв'язується з лігандом X^4 . Даний спосіб переважно включає взаємодію клітинного препарату, який містить мішень, з іммобілізованою сполукою, з утворенням комплексу між рецептором та іммобілізованою сполукою.

Цитотоксин даного винаходу можна іммобілізувати на афінному носії будь-якими визнаними в даній галузі способами. По-іншому, цитотоксин можна іммобілізувати, використовуючи один або більше лінкерів даного винаходу.

Ще в іншому типовому варіанті винахід стосується матриксу для афінного очищення, який включає лінкер даного винаходу.

Спосіб даного винаходу для виділення мішені звичайно використовує одну або більше методик афінної хроматографії. Афінна хроматографія дає можливість ефективно виділяти вид, наприклад, біологічні молекули або біополімери, використовуючи їх сайти розпізнавання для деяких хімічних структур на носії з високою мірою селективності. Література наповнена статтями, монографіями і книгами з афінної хроматографії, включаючи такі теми як носії для афінної хроматографії, зшиті компоненти, ліганди і їх одержання і застосування. Вибірка таких посилань включає: [Ostrove, *Methods Enzymol.* 182: 357-71 (1990); Fement, *Bioeng.* 70: 199-209 (1990). Huang та інш., *J. Chromatogr.* 492: 431-69 (1989); "Purification of enzymes by heparin-Sepharose affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 184: 335-45 (1980); Farooqi, *Enzyme Eng.*, 4: 441-2 (1978); Nishikawa, *Chem. Technol.* 5(9): 564-71 (1975); Guilford та інш., in, *Pract. High Perform. Liq. Chromatogr.*, Simpson (ed.), 193-206 (1976); Nishikawa, *Proc. Int. Workshop Technol. Protein Sep. Improv. Blood Plasma Fractionation*, Sandberg (ed.), 422-35; (1977) "Affinity Chromatography of enzymes", *Affinity Chromatogr.*, *Proc. Int. Symp.* 25-38, (1977) (Pub. 1978); і *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, Dean та інш. (ed.), IRL Press Limited, Oxford, England (1985)]. Фахівці в даній галузі мають достатньо керівництв з розробки конкретних способів афінної хроматографії, що використовують матеріали даного винаходу.

В даному способі можна використати як носії середовище для афінної хроматографії різної хімічної структури. Наприклад, як матеріали носіїв придатні агарозні гелі і зшиті агарозні гелі, оскільки гідрофільність робить їх відносно вільними від неспецифічного зв'язування. Інші придатні носії включають, наприклад, окляні гранули з регульованими порами (CPG), частинки целюлози, гранули поліакриламідного гелю і гранули гелю Sephadex™, одержані з декстрану і епіхлоргідриду.

Способи застосування кон'югатів ліки-ліганд

Крім описаних вище композицій і конструкцій даний винахід також стосується ряду способів, які можна застосовувати на практиці, використовуючи сполуки і кон'югати за даним винаходом. Способи застосування кон'югату ліки-ліганд за даним винаходом включають: знищення або інгібування зростання або реплікації пухлинної клітини або ракової

клітини, лікування раку, лікування передракового стану, знищення або інгібування зростання або реплікації клітини, яка експресує аутоімунне антитіло, лікування аутоімунного захворювання, лікування інфекційного захворювання, профілактику розмноження пухлинної клітини або ракової клітини, профілактику раку, профілактику розмноження клітини, яка експресує аутоімунне антитіло, профілактику аутоімунного захворювання і профілактику інфекційного захворювання. Дані способи застосування включають введення потребуючий цього тварині, такий як ссавець або людина, ефективною кількістю кон'югату ліки-ліганд. Переважні ліганди для багатьох описаних тут способів застосування включають антитіла і фрагменти антитіл, які націлені на конкретну пухлинну клітину, ракову клітину або іншу намічену ділянку.

Комплекс ліки-ліганд за даним винаходом придатний для лікування раку, аутоімунного захворювання та інфекційного захворювання у тварини. Забезпечені композиції і способи лікування пухлин, що доставляють композицію, яка обговорюється, фармацевтично прийнятним способом при фармацевтично ефективній кількості композиції даного винаходу.

Даний винахід особливо придатний для лікування раку та інгібування розмноження пухлинних клітин або ракових клітин у тварини. Рак або передраковий стан, включаючи, але, не обмежуючись цим, пухлину, метастаз або будь-яке захворювання або порушення, що характеризується нерегульованим зростанням клітин, можна лікувати або проводити його профілактику за допомогою введення комплексу ліки-ліганд за даним винаходом. Комплекс доставляє ліки до пухлинної клітини або ракової клітини. В одному варіанті ліганд специфічно зв'язує або асоціюється з антигеном, асоційованим з раковою клітиною або пухлинною клітиною. Завдяки своєму близькому сусідству з лігандом, ліки можуть поглинатись пухлинною клітиною або раковою клітиною, наприклад, за допомогою рецептор-опосередкованого ендцитозу. Антиген може бути приєднаний до пухлинної клітини або ракової клітини або може являти собою позаклітинний матриксний білок, асоційований з пухлинною клітиною або раковою клітиною. Будучи всередині клітини, лінкер гідролітично відщеплюється протеазами, асоційованими з пухлинною клітиною або раковою клітиною, вивільняючи при цьому ліки. Вивільнені ліки далі стають вільні для дифузії та індукування цитотоксичних активностей. В альтернативному варіанті ліки відщеплюються від комплексу ліки-ліганд поза пухлинною клітиною або раковою клітиною, і потім ліки проникають в клітину.

Ліганд може бути пов'язаний, наприклад, з пухлинною клітиною або раковою клітиною, антигеном пухлинної клітини або ракової клітини, який знаходиться на поверхні пухлинної клітини або ракової клітини, або з антигеном пухлинної клітини або ракової клітини, який являє собою позаклітинний матриксний білок, асоційований з пухлинною клітиною або раковою клітиною. Ліганд може бути призначений спеціально для конкретного типу пухлинних клітин або ракових клітин. Отже, вибира-

ючи ліганд, можна змінювати тип пухлин або ракових захворювань, який можна ефективно лікувати.

Типові приклади передракових станів, які можуть бути цільовими для кон'югату ліки-ліганд, включають, але не обмежені цим: метаплазію, гіперплазію, дисплазію, колоректальні поліпи, актинічний кетатоз, актинічний хейліт, людський вірус папіломи, лейкоплакію, безболісне виникнення виразок і пошкоджень шкіри і хвороба Боуена.

Типові приклади ракових захворювань або пухлин, які можуть представляти цілі для кон'югату ліки-ліганд, включають, але не обмежені цим: рак легень, рак ободової кишки, рак простати, лімфому, меланому, рак молочної залози, рак яєчників, тестикулярний рак, рак ЦНС, ренальний рак, рак нирки, рак підшлункової залози, рак шлунку, оральний рак, носовий рак, цервікальний рак і лейкоз. Звичайний фахівець легко зрозуміє, що конкретний направляючий ліганд, що використовується в кон'югаті, можна вибрати таким чином, щоб він цілеспрямовано доставляв ліки до пухлинної тканини, що підлягає обробці даними ліками (а саме, вибрати направляючий агент, специфічний відносно пухлини-специфічного антигену). Приклади таких направляючих лігандів добре відомі в даній галузі, їх необмежувальні приклади включають анти-Her2 для лікування раку молочної залози, анти-CD20 для лікування лімфоми, анти-PSMA для лікування раку простати і анти-CD30 для лікування лімфом, включаючи неходжкінську лімфому.

В одному варіанті даний винахід стосується способу знищення клітини. Даний спосіб включає введення в клітину деякої кількості сполуки даного винаходу, достатньої для загибелі вказаної клітини. У типовому варіанті сполуку вводять суб'єкту, який несе дану клітину. Ще в одному типовому варіанті введення сприяє уповільненню або припиненню зростання пухлини, яка включає дану клітину (наприклад, клітина може являти собою пухлинну клітину). Для введення з метою уповільнення зростання швидкість зростання клітин повинна бути щонайменше на 10% менше, ніж швидкість зростання до введення. Переважно, щоб швидкість зростання уповільнювалась щонайменше на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% або зростання повністю припинялось.

Ефективне дозування

Фармацевтичні композиції, придатні для використання в даному винаході, включають композиції, в яких активний інгредієнт міститься в терапевтично ефективній кількості, а саме, в кількості, ефективній для досягнення передбачуваної мети. Дійсна кількість, ефективна для конкретного застосування, залежить, серед іншого, від умов лікування. Фахівець в даній галузі легко здатний визначити ефективної кількості, особливо в світлі наведеного тут докладного розкриття.

Для будь-якої описаної тут сполуки терапевтично ефективну кількість можна спочатку визначити з дослідження клітинної культури. Цільові концентрації в плазмі дорівнюють таким концентраціям активної сполуки(сполук), які здатні інгібувати зростання або розподіл клітин. У переважних варіантах клітинна активність інгібується щонайменше на 25%. У цей час переважні цільові концентрації в

плазмі активної сполуки(сполук), які здатні викликати щонайменше приблизно 50%, 75% або навіть 90% або більш сильне інгібування клітинної активності. Процент інгібування клітинної активності у пацієнта можна контролювати з метою оцінки правильності досягнутої концентрації ліків в плазмі, і можна регулювати дозу, підвищуючи її або знижуючи, для досягнення необхідної міри інгібування.

Як добре відомо в даній галузі, терапевтично ефективні кількості для застосування на людях також можна визначити на тваринних моделях. Наприклад, дозу для людей можна сформулювати таким чином, щоб досягнути такої циркулюючої концентрації, яка, як виявлено, є ефективною у тварин. Дозування у людей можна регулювати, контролюючи клітинне інгібування і підвищуючи або знижуючи дозу, як описано вище.

Терапевтично ефективну дозу можна також визначити з даних із застосування людиною сполук, для яких відомо, що вони демонструють аналогічну фармакологічну активність. Дози, що застосовуються, можна регулювати на основі відносної біологічної доступності і ефективності сполуки, що вводиться, у порівнянні з відомою сполукою.

Фахівець в даній галузі здатний легко визначити регульовану дозу для досягнення максимальної ефективності у людей, основуючись на описаних вище способах та інших способах, які добре відомі в даній галузі.

У випадку локального застосування системні циркулюючі в крові концентрації сполуки, що вводиться, не є особливо важливими. У таких випадках сполуку вводять таким чином, щоб забезпечити в локалізованій ділянці концентрацію, ефективну для досягнення передбачуваного результату.

Для використання при профілактиці і/або лікуванні захворювань, що відносяться до аномальної клітинної проліферації, переважно є циркулююча концентрація сполуки, що вводиться, приблизно від 0,001 до 20мкМ, переважно приблизно від 0,01 до 5мкМ.

Дози для перорального введення пацієнту описаних тут сполук звичайно складають приблизно від 1 до 10000мг/день, частіше приблизно від 10 до 1000мг/день і найбільш типово приблизно від 50 до 500мг/день. Типові дози, встановлені з урахуванням маси пацієнта, складають приблизно від 0,01 до 150мг/кг/день, частіше приблизно від 0,1 до 15мг/кг/день і найбільш типово приблизно від 1 до 10мг/кг/день, наприклад, 5мг/кг/день або 3мг/кг/день.

Для інших способів введення можна індивідуально регулювати кількість доз та інтервал між прийомами, забезпечуючи рівні сполуки, що вводиться, в плазмі, ефективні для конкретного клінічного показання, що підлягає лікуванню. Наприклад, в одному варіанті, можна вводити сполуку за даним винаходом при відносно високих концентраціях декілька разів на день.

По-іншому, може бути більш бажаним вводити сполуку даного винаходу при мінімальних ефективних концентраціях і застосовувати схему прийому з менш частим введенням. Це забезпечить тера-

певтичний режим, який відповідає тяжкості захворювання індивідуума.

Використовуючи наведений тут опис, можна планувати ефективний режим терапевтичного лікування, який не дає істотної токсичності і цілком ефективний для лікування клінічних симптомів, що демонструються конкретним пацієнтом. Це планування повинно включати ретельний вибір активної сполуки при розгляді таких факторів як ефективність сполуки, відносна біологічна доступність, маса тіла пацієнта, наявність і тяжкість небажаних побічних ефектів, переважний спосіб введення і профіль токсичності вибраного агента.

Сполуки, композиції і способи даного винаходу додатково проілюстровані прикладами, які наведені далі. Дані приклади пропонуються для ілюстрації, а не для обмеження заявленого винаходу.

Приклади

Матеріали і способи

У наведених нижче прикладах, якщо не указано по-іншому, температури дані в градусах Цельсія (°C); операції проводять при кімнатній температурі або температурі навколишнього середовища (звичайно в діапазоні приблизно 18-25°C; випаровування розчинника проводять, використовуючи роторний випарник при зниженому тиску (звичайно 4,5-30мм рт.ст.) при температурі бані до 60°C; за протіканням реакцій звичайно стежать способом ТШХ і часи реакцій наводять тільки для ілюстрації; температури плавлення дані без поправок; продукти демонструють задовільні ¹H-ЯМР і/або мікроаналітичні дані; виходи наведені тільки для ілюстрації; і також використовуються

наступні загальновідомі скорочення: т.пл. (температура плавлення), л (літр(и)), мл (мілілітр), ммоль (мілімоль), г (грами), мг (міліграми), хв. (хвилини), РХ-МС (рідинна хроматографія-мас-спектрометрія) і год. (години). ¹H-ЯМР спектри виміряні на спектрометрі Varian Mercury 300МГц і узгоджуються з заданими структурами. Хімічні зсуви наводяться в мільйонних частках (м. ч.) в області низьких полів відносно тетраметилсилану. Мас-спектри з електророзпиленням реєструють на мас-спектрометрі Perkin Elmer Sciex API 365. Елементний аналіз проводять за допомогою Robertson Microлит Laboratories, Madison, NJ. Для флеш-хроматографії використовують силікагель марки E. Merck (230-400меш). Аналітичну ВЕРХ зі зворотною фазою проводять на установці HP 1100 або Varian ProStar 210 з колонкою Phenomenex Luna 5мкм C-18(2) 150мм×4,6мм або колонкою Varian Microsorb-MV 0,1мкм C-18 150мм×4,6мм. Швидкість потоку становить 1мл/хв. з градієнтом від 0 до 50% буфера В за 15хв. або від 10 до 100% буфера В за 10хв. з УФ детектуванням при 254нм. Буфер А: 20мм формиат амонію +20% ацетонітрил або 0,1% трифтороцтова кислота в ацетонітрилі; буфер В: 20мм формиат амонію +80% ацетонітрил або 0,1% водна трифтороцтова кислота. Препаративну ВЕРХ зі зворотною фазою проводять на установці Varian ProStar 215 з колонкою Waters Delta Pak 15мкм 3-18 300мм×7,8мм.

Приклад 1: Синтез кон'югатів з пептидними лінкером

1.1a Методологія синтезу

СХЕМА 1

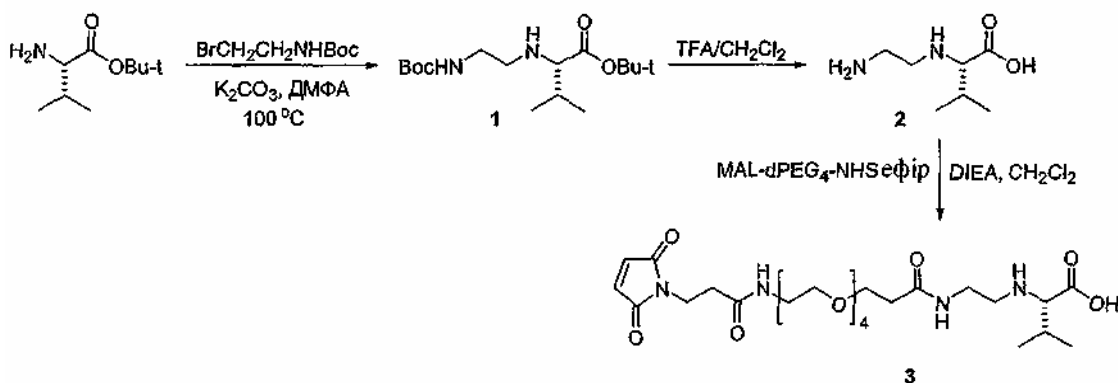
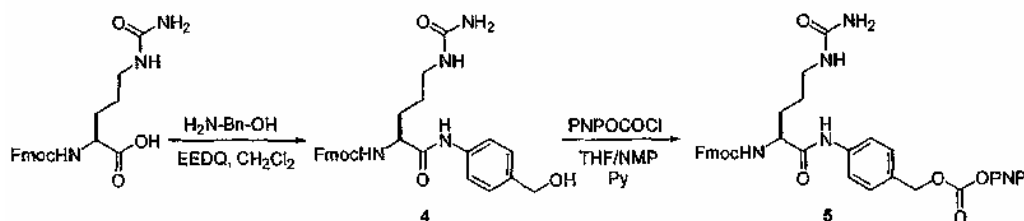
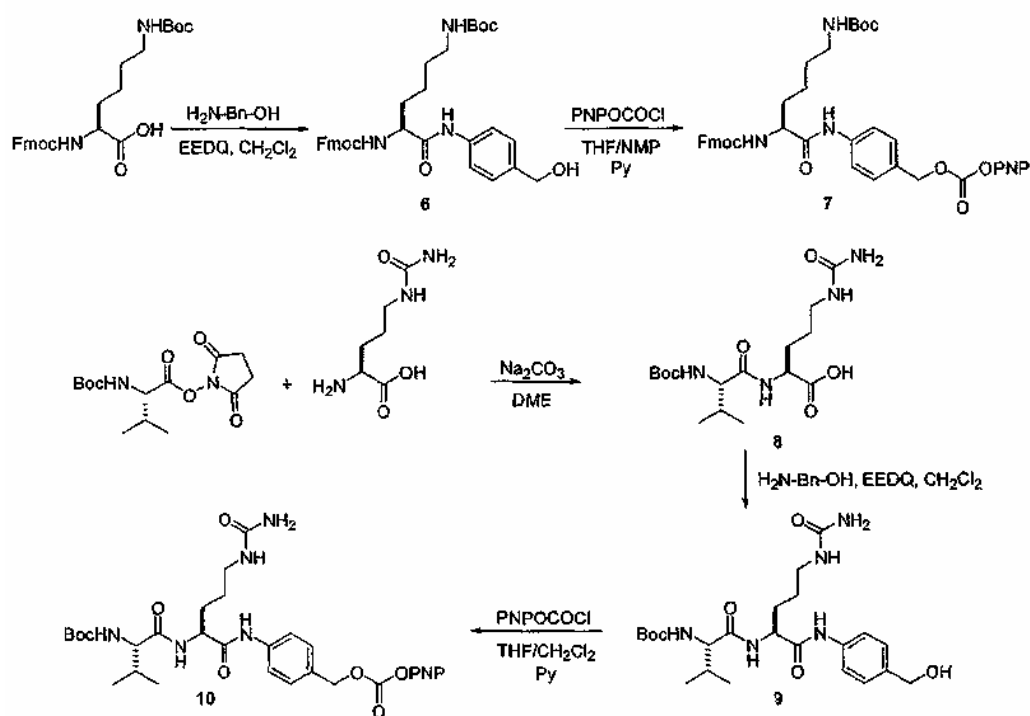
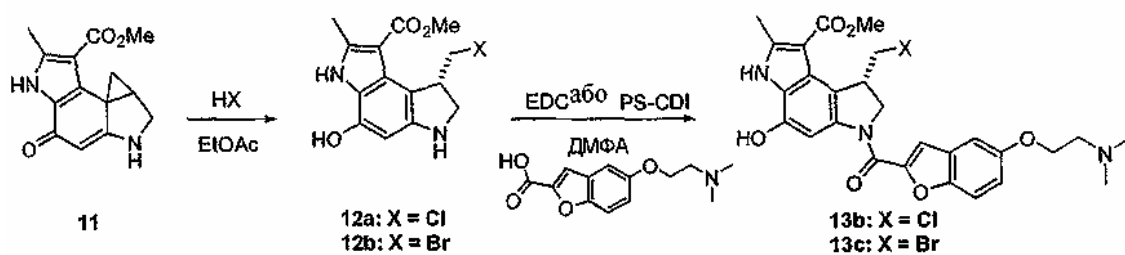


СХЕМА 2

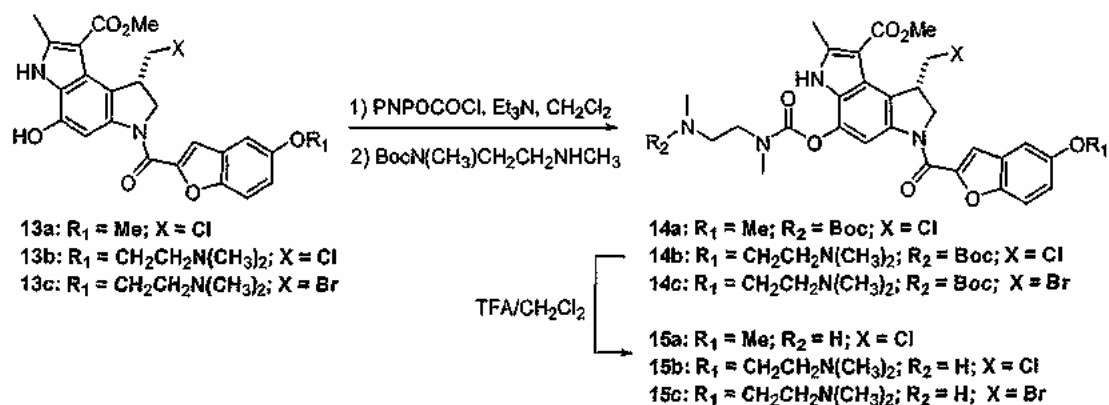


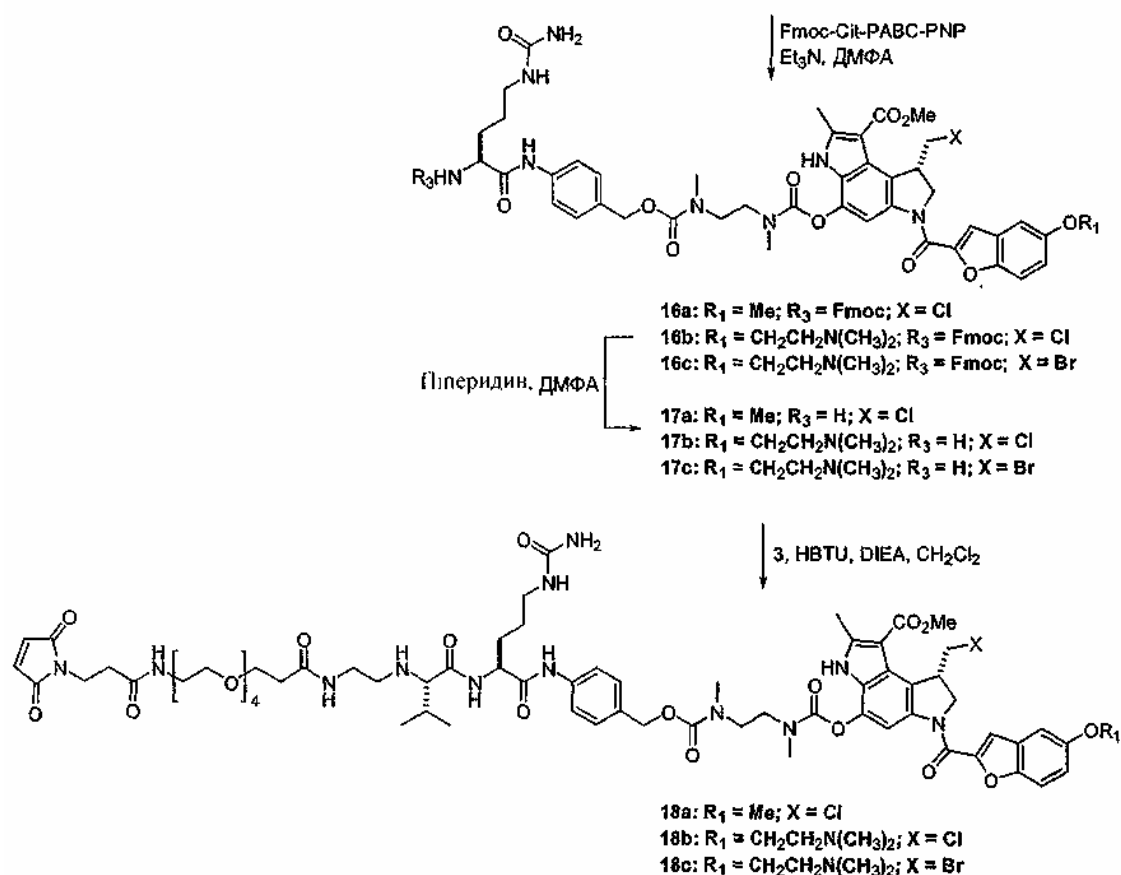


CXEMA 3

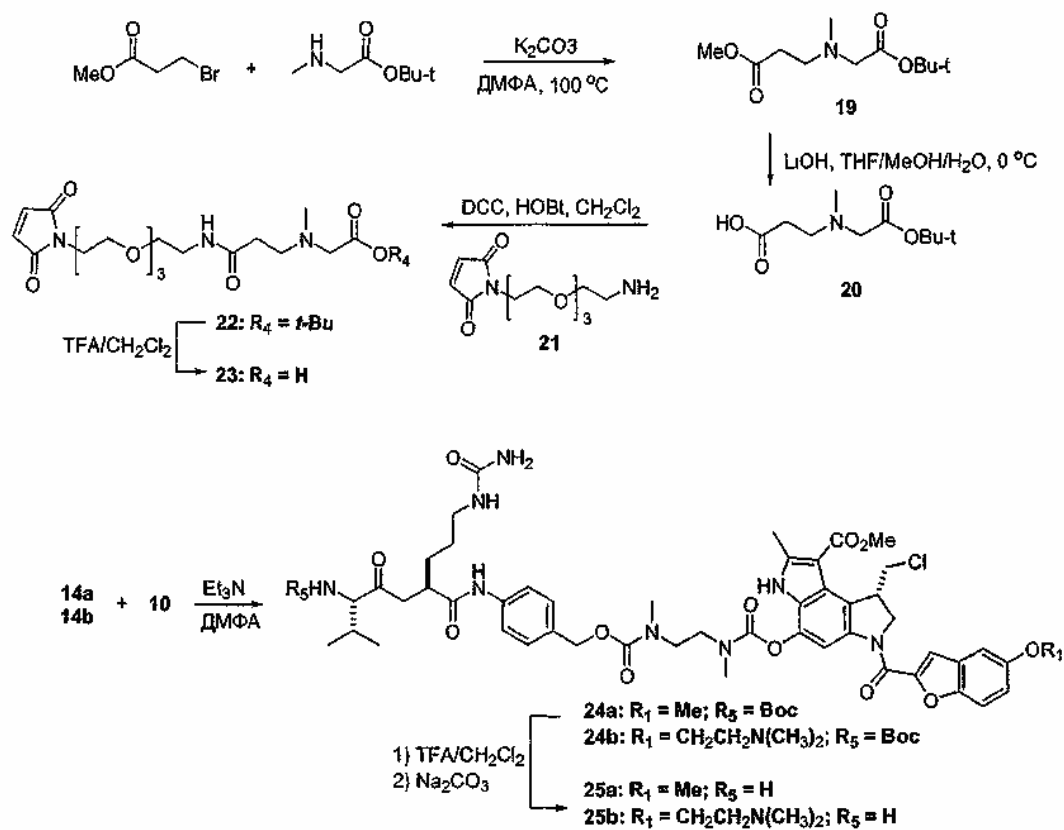


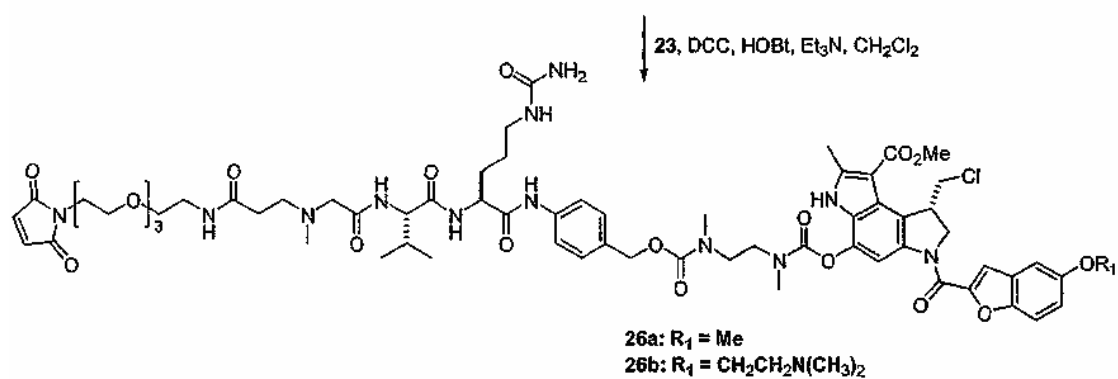
CXEMA 4



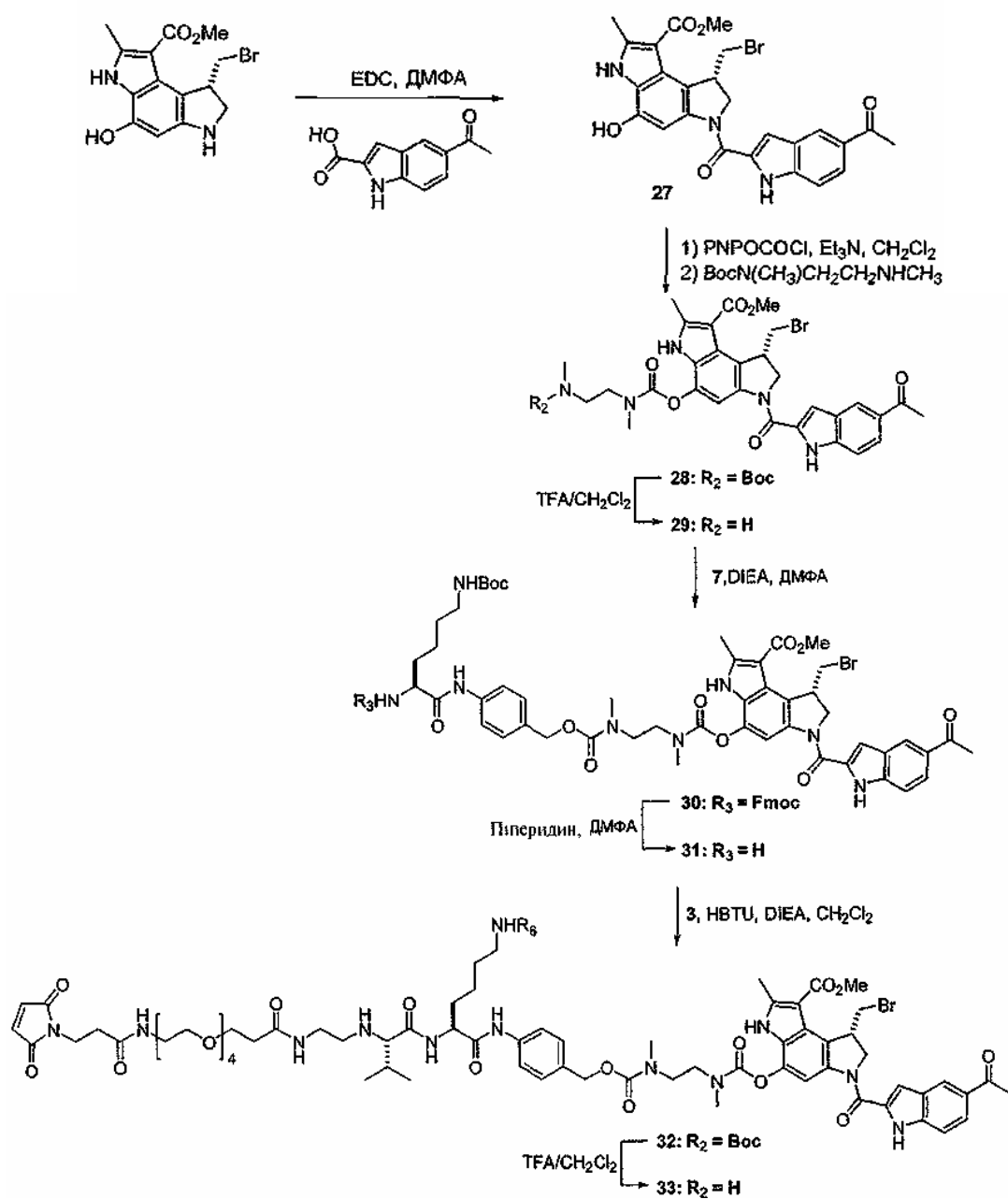


CXEMA 5





CXEMA 6



1.1b Синтез сполуки 1: трет-бутилового ефіру N-[2'-N'-трет-бутоксикарбо-ніламіно)етил]валіну.

До розчину 2-(N-трет-бутоксикарбо-ніламіно)етилброміду (1г, 4,5ммоль) і трет-бутилового ефіру валіну (0,936г, 4,5ммоль) в ДМФА (10мл) додають карбонат калію (1,85г, 13,5ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при 100°C протягом ночі. Реакційну суміш концентрують і очищають залишок методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент суміш етилацетат/гексан (3/7) і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії (0,16г, 12%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ: 0,94 (нечіткий т, 6H), 1,44 (с, 9H), 1,473 і 1,475 (2с, 9H), 1,88 (м, 1H), 2,51 (м, 1H), 2,78 (м, 2H), 3,11 (м, 1H), 3,22 (м, 1H), 3,39 і 4,13 (2 ш.т, 1H), 5,00 (ш.с, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 205 (M+H⁺-112), 261 (M+H⁺-Bu), 317 (M+H⁺).

1.1c Синтез сполуки 2: N-(2-Аміноетил)валіну. Сполуку 1 (137мг, 0,43ммоль) розчиняють в розчині ТФА/дихлорметан (2мл, 1/1) при кімнатній температурі. Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30хв. Реакційну суміш концентрують досуха, одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії (0,18г, 95%). ¹H ЯМР (CD₃OD) δ: 1,07 і 1,16 (2д, 6H), 2,35 (м, 1H), 3,2 (м, 1H), 3,38 (м, 4H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 217 (M+H⁺).

1.1d Синтез сполуки 3. До розчину малеамід-dPEG₄NHS-ефіру (61мг, 0,16 15ммоль) в дихлорметані (2мл) додають по краплі сполуку 2 (80,7мг, 0,16ммоль) і діізопропшетиламін (55,5мкл, 0,32ммоль) в дихлорметані (1мл). Одержану таким чином суміш перемішують протягом ночі. Розчинник видаляють на роторному випарнику і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент дихлорметан, потім 5% метанол в дихлорметані і на завершення 100% метанол і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді безбарвної олії (87мг, 97%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ: 1,08 (дд, 6H), 2,25 (м, 1H), 2,49 (т, 2H), 2,52 (т, 2H), 3,10-3,79 (м, 25H), 6,82 (с, 2H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 559 (M+H⁺).

1.1e Синтез сполуки 4: Fmoc-Cit-PABOH. До розчину Fmoc-Cit-OH (1,0г, 2,52ммоль) і 4-амінобензилового спирту (341мг, 2,77ммоль) в дихлорметані (10мл) і метанолі (5мл) додають 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохінолін [EEDQ] (1,24г, 5,04ммоль) однією порцією. Суміш перемішують в темряві протягом 16 годин. Розчинники видаляють на роторному випарнику, і тверду речовину білого кольору розтирають в ефірі (100мл). Одержану суспензію обробляють ультразвуком протягом 5хв. і потім залишають стояти на 30хв. Тверду речовину білого кольору збирають фільтруванням, промивають ефіром і сушать у вакуумі (1,23г, 97%). ¹H ЯМР (DMCO) δ: 1,32-1,52 (м, 2H), 1,52-1,74 (дм, 2H), 2,86-3,06 (дм, 2H), 4,1 (м, 1H), 4,42 (д, 2H), 5,07 (т, 1H), 5,40 (ш.с, 2H), 5,97 (т, 1H), 7,19-7,95 (м, 12H), 8,10 (д, 1H), 9,97 (с, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 503,1 (M+H⁺).

1.1f Синтез сполуки 5: Fmoc-Cit-PABC-PNP. До розчину сполуки 4 (309мг, 0,62ммоль) і паранітрофенілхлорформіату (372мг, 1,85ммоль) в тетрагідрофурані (30мл) і 1-метил-2-піролідіні (1мл) додають піридин (100мкл, 1,23ммоль) однією порцією. Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30хв. Розчинники видаляють на роторному випарнику і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент дихлорметан, потім 3% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (97,9мг, 70%). PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 668 (M+H⁺).

1.1g Синтез сполуки 6: Fmoc-Lys(Boc)-PABOH. Сполуку 6 одержують, як описано вище для сполуки 4 з 98% виходом. ¹H ЯМР (DMCO) δ: 1,40 (с, 9H), 1,38 (м, 2H), 1,50-1,74 (дм, 2H), 3,04 (т, 2H), 3,30 (кв, 3H), 4,19-4,31 (м, 2H), 4,41 (д, 2H), 4,55 (с, 2H), 7,28-7,68 (м, 12H), 8,00 (д, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 574 (M+H⁺).

1.1h Синтез сполуки 7: Fmoc-Lys(Boc)-PABC-PNP. Сполуку 7 одержують, як описано вище для сполуки 5 з 70% виходом. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ: 1,44 (с, 9H), 1,49-1,60 (м, 20 6H), 1,73 (м, 1H), 2,00 (м, 1H), 3,11 (м, 1H), 3,20 (ш.с, 1H), 4,23 (м, 2H), 4,46 (ш.с, 2H), 4,67 (ш.с, 1H), 5,56 (ш.с, 1H), 7,28 (м, 2H), 7,36-7,41 (м, 6H), 7,59 (м, 4H), 7,76 (д, 2H), 8,26 (дд, 2H), 8,45 (ш.с, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 639 (M+H⁺-Boc), 684 (M+H⁺-Bu), 739 (M+H⁺), 778.

1.1i Синтез сполуки 8: Boc-Val-Cit-OH. До розчину цитруліну (2,54г, 14,50ммоль) і бікарбонату натрію (1,28г) у воді (40мл) додають Boc-Val-OSu (4,34г, 13,81ммоль), розчинений в диметоксетані (DME). Для збільшення розчинності суміші додають тетрагідрофуран (10мл). Одержану таким чином суміш залишають перемішуватись протягом ночі при кімнатній температурі. Додають водну лимонну кислоту (15%, 75мл) і суміш екстрагують сумішшю 10% 2-пропанол/етилацетат (2×100мл). Органічний шар промивають насиченим розчином солі (2×150мл) і розчинники видаляють на роторному випарнику. Одержану тверду речовину білого кольору сушать у вакуумі протягом 5 год. і потім обробляють ефіром (100мл). Після короткої обробки ультразвуком і розтирання збирають твердий продукт білого кольору фільтруванням (1,39г, 27%). ¹H ЯМР (CD₃OD) δ: 0,91 (дд, 3H), 0,98 (дд, 3H), 1,44 (с, 9H), 1,70 (м, 2H), 1,87 (м, 2H), 2,02 (м, 2H), 3,11 (т, 2H), 3,89 (т, 1H), 4,39 5 (кв, 1H), 8,22 (д, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 375 (M+H⁺).

1-1j Синтез сполуки 9: Boc-Val-Cit-PABOH. Сполуку 9 одержують, як описано вище для сполуки 4 з 71% виходом. ¹H ЯМР (CD₃OD) δ: 0,93 і 0,97 (2д, 6H), 1,44 (с, 9H), 1,58 (м, 2H), 1,75 (м, 1H), 1,90 (м, 1H), 2,05 (м, 1H), 3,10 (м, 1H), 3,19 (м, 1H), 3,91 (д, 1H), 4,52 (м, 1H), 5,25 (с, 2H), 7,40 (д, 2H), 7,45 (дд, 2H), 7,64 (д, 4H), 8,29 (дд, 2H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 480 (M+H⁺).

1.1k Синтез сполуки 10: Boc-Val-Cit-PABC-PNP. Розчин Boc-Val-Cit-PABOH (178мг,

0,370ммоль) в ТГФ (8мл) в CH_2Cl_2 (4мл) перемішують при кімнатній температурі з РНР-хлорформіатом (160мг, 0,80ммоль) і піридином (65мкл, 0,80ммоль) протягом 3 годин. Додають до реакційної суміші етилацетат (100мл) і 10% водну лимонну кислоту (50мл) і органічний шар промивають насиченим розчином солі, сушать і концентрують, залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі використовуючи як елюент 5% метанол і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (165мг, 70%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 0,93 (дд, 3H), 0,97 (дд, 3H), 1,44 (с, 9H), 1,58 (м, 2H), 1,75 (м, 1H), 1,89 (м, 1H), 2,05 (м, 1H), 3,10 (м, 1H), 3,20 (м, 1H), 3,90 (д, 1H), 4,51 (м, 1H), 4,55 (с, 2H), 7,29 (д, 2H), 7,55 (д, 2H) м.ч.; РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 545 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Boc}$), 645 ($\text{M}+\text{H}^+$), 667 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 683 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1l Синтез сполуки 12a. Через суспензію сполуки 11 (20мг, 0,078ммоль) в етилацетаті (5мл) барботують газоподібний HCl протягом 20хв. (поки суспензія не стане прозорим розчином). Реакційну суміш перемішують ще 5хв., потім суміш концентрують досуха, одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини жовтого кольору (26мг, 100%), яку використовують на наступній стадії без додаткового очищення. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 260 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Cl}$), 295 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1m Синтез сполуки 12b. Через суспензію сполуки 11 (20мг, 0,078ммоль) в етилацетаті (5мл) барботують газоподібний HBr протягом 20хв. (поки суспензія не стане прозорим розчином). Реакційну суміш перемішують ще 5хв., потім суміш концентрують досуха, одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини жовтого кольору (33мг, 100%), яку використовують на наступній стадії без додаткового очищення. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 260 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Br}$), 339 ($\text{M}+\text{H}^+$), 341 ($\text{M}+\text{H}^++2$).

1.1n Синтез сполуки 13b. До розчину сполуки 12a (26мг, 0,078ммоль) в ДМФА (2мл) додають 5-(2-диметиламіноетокси)бензофуран-2-карбонову кислоту (44мг, 0,155ммоль) і EDC (30мг, 0,155ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин. Суміш концентрують і залишок розчиняють в суміші $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TOA}$ (4/1,5/0,5; 6мл) і вміщують в морозилку на 3 години. Тверду речовину жовтого кольору збирають фільтруванням (35мг, 85%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 2,67 (с, 3H), 3,01 (с, 6H), 3,34 (м, 2H), 3,63 (нечіткий т, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,91 (м, 1H), 4,41 (м, 3H), 4,54 (м, 1H), 4,65 (м, 1H), 7,20 (дд, 1H), 7,36 (д, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,59 (д, 1H), 7,73 (ш.с, 1H), 11,75 (с, 1H) м.ч.; РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Cl}$), 526 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1o Синтез сполуки 13c. До розчину сполуки 12b (19мг, 0,0387) в ДМФА (2мл) додають сіль 5-(2-диметиламіноетокси)бензофуран-2-карбонова кислота. HBr (25мг, 0,0775ммоль) і PS -карбодіімід (82мг, ммоль/г: 0,94, 0,0775ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 24 годин. Після фільтрування, фільтрат концентрують і залишок розчиняють в суміші $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{ТФА}$ (2/0,75/0,25; 3мл) і вміщують в

морозилку на 3 години. Тверду речовину жовтого кольору збирають фільтруванням і сушать, одержуючи вказану в заголовку сполуку (18мг, 82%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Br}$), 570 ($\text{M}+\text{H}^+$), 572 ($\text{M}+\text{H}^++2$).

1.1p Синтез сполуки 14a. До суспензії сполуки 13a (48мг, 0,10ммоль) в дихлорметані (4мл) додають пара-нітрофеніл хлорформіат (80мг, 0,40ммоль) і триетиламін (56мкл, 0,40ммоль) при -78°C . Суміш повільно нагрівають до кімнатної температури і перемішування продовжують ще 30хв. До реакційної суміші додають сполуку $\text{N-Boc-N,N'$ -диметилетилендіамін (166мг, 0,80ммоль) і перемішують протягом ночі. Суміш концентрують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1,25% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (71мг, 100%) ^1H ЯМР δ : 1,45-1,47 (м, 9H), 2,69 (с, 3H), 2,97 (с, 3H), 3,14-3,34 (м, 4H), 3,81-3,92 (м, 8H), 4,38-4,47 (м, 3H), 4,70 (д, 1H), 7,05 (дд, 1H), 7,11 (д, 1H), 7,45 (с, 1H), 7,48 (д, 1H), 7,99 (с, 1H), 10,43 (с, 1H) м.ч.. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 710 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1q Синтез сполуки 14b. До суспензії сполуки 13b (48мг, 0,075ммоль) в дихлорметані (2мл) додають 4-нітрофеніл хлорформіат (80мг, 0,4ммоль) і триетиламін (40мг, 0,4ммоль, 56мкл) при 0°C . Суміш нагрівають до кімнатної температури і перемішування продовжують ще 6 годин. Розчинник випаровують і залишок промивають ефіром, одержуючи проміжний продукт. Даний проміжний продукт розчиняють в дихлорметані (2мл) і до реакційного розчину додають $\text{N-Boc-N,N'$ -диметилетилендіамін (44мг, 0,2ммоль) і триетиламін (20мг, 0,2ммоль, 28мкл). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш концентрують і залишок очищають методом ВЕРХ на колонці C-18 , використовуючи як елюент амонійформіат (20мм, $\text{pH}7,0$) і ацетонітрил і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (31мг, 54%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 755 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1r Синтез сполуки 14c. До суспензії сполуки 13c (24мг, 0,04ммоль) в CH_2Cl_2 (2мл) додають пара-нітрофенілхлорформіат (64мг, 0,32ммоль) і триетиламін (22мкл, 0,16ммоль) при 0°C . Одержану таким чином реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин. До реакційної суміші додають $\text{N-Boc-N,N'$ -диметилетилендіамін (94мг, 0,50ммоль) і перемішування продовжують ще 50хв. Реакційну суміш концентрують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 5% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (28мг, 83%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 570, 684 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{Boc}$), 784 ($\text{M}+\text{H}^+$), 805 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 722 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1s Синтез сполуки 15a. Сполуку 14a (70мг, 0,10ммоль) розчиняють в трифтороцтовій кислоті (5мл) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30хв. і концентрують досуха, продукт (72мг, 100%) використовують на наступній стадії

без додаткового очищення. ВЕРХ показує, що він має чистоту >95%. ^1H ЯМР δ : 2,64 (с, 3H), 2,93 (с, 3H), 3,19 (с, 3H), 3,30 (т, 1H), 3,79 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 3,81-3,85 (м, 1H), 4,27-4,49 (м, 3H), 4,59 (д, 1H), 4,68 (д, 1H), 6,97 (дд, 1H), 7,03 (д, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,41 (д, 1H), 8,00 (ш.с, 1H), 10,61 (ш.с, 1H) м.ч. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 612 ($\text{M}+\text{H}^+$), 634 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

1.1t Синтез сполуки 15b. Сполуку 15b одержують, як описано вище для сполуки 15a, з 100% виходом. ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 2,69 (с, 3H), 2,76 (с, 3H), 2,83 (ш.с, 1H), 3,01 (с, 6H), 3,08 (ш.с, 1H), 3,24 (ш.с, 2H), 3,42 (м, 2H), 3,63 (ш.с, 3H), 3,74 (ш.с, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,92 (м, 1H), 4,40 (ш.с, 2H), 4,57 (ш.с, 2H), 4,71 (ш.с, 1H), 7,22 (ш.д, 1H), 7,36 (с, 1H), 7,56 (с, 1H), 7,59 (д, 1H), 8,04 (ш.с, 1H) м.ч.; РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 526, 640 ($\text{M}+\text{H}^+$), 678 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1u Синтез сполуки 15c. Сполуку 15c одержують, як описано вище для сполуки 15a, з 100% виходом. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 570, 684 ($\text{M}+\text{H}^+$), 722 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1v Синтез сполуки 16a. До розчину сполуки 5 (12,5мг, 0,019ммоль) і сполуки 15a (10мг, 0,014) в диметилформаміді (200мкл) додають триетиламін (6мкл, 0,044ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Додають до суміші ефір (5мл) і з розчину випадає осад твердої речовини білого кольору. Тверді речовини відфільтровують і очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент дихлорметан, потім 1% метанол в дихлорметані, 2% метанол в дихлорметані, 3% метанол в дихлорметані і в завершення 4% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану сполуку у вигляді твердої речовини білого кольору (8,7мг, 56%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 470, 1112 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1134 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1150 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1w Синтез сполуки 16b. До розчину сполуки 15b (5мг, 0,0056ммоль) в ДМФА (0,35мл) додають сполуку 5 (3,8мг, 0,0056ммоль) і DIEA (2мкл, 0,011ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 5 година. Суміш концентрують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 10% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини (3мг, 45%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 526, 1169 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1208 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1x Синтез сполуки 16c. Сполуку 16c одержують, як описано вище для сполуки 16b, з 50% виходом. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 570, 1212 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1250 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1y Синтез сполуки 17a. До розчину сполуки 16a (8,7мг, 0,008ммоль) в диметилформаміді (500мкл) додають піперидин (100мкл) однією пор-

цією. Одержану таким чином суміш перемішують протягом 20хв. при кімнатній температурі. Розчинник видаляють на роторному випарнику і вміщують суміш у високий вакуум на 1,5 годину. Залишок витягують мінімальною кількістю дихлорметану (100мкл) і додають до розчину гексан (3мл), з розчину випадає тверда речовина білого кольору, яку відфільтровують і сушать (6,7мг, 96,7%). МС (електророзпилення) 470, 890,1 ($\text{M}+\text{H}^+$), 912 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 928 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1z Синтез сполуки 17b. Сполуку 17b одержують, як описано вище для сполуки 17a з 95% виходом. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 947 ($\text{M}+\text{H}^+$).

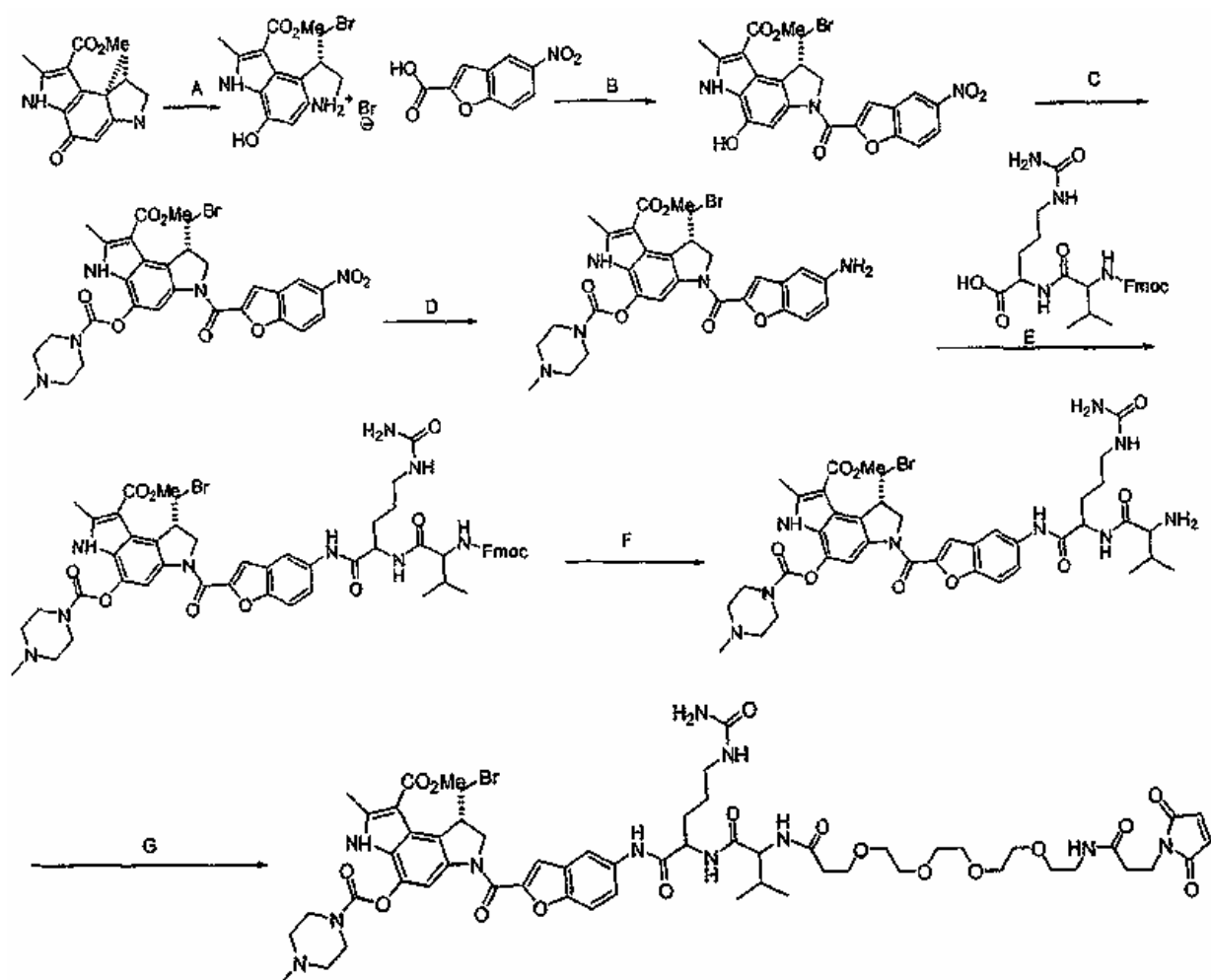
1.1aa Синтез сполуки 17c. Сполуку 17c одержують, як описано вище для сполуки 17a з 95% виходом. РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 1015 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1bb Синтез сполуки 18a. До розчину сполуки 17a (4,2мг, 0,005ммоль) і сполуки 3 (2,64мг, 0,005ммоль) в дихлорметані (1мл) додають однією порцією РубОР (3,7мг, 0,007ммоль), а потім діізопропілетиламін (1мкл). Одержану таким чином суміш перемішують протягом ночі при кімнатній температурі. Розчинники видаляють на роторному випарнику. Залишок очищають методом препаративної ВЕРХ, одержуючи бежеву тверду речовину (2,6мг, 38,7%). МС (електророзпилення) 470, 1431 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1453 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1469 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1cc Синтез сполуки 18b. До розчину сполуки 17b (2,2мг, 0,0025ммоль) і сполуки 3 в 5% метанолі в дихлорметані (400мл) додають НВТУ (9мг, 0,0046ммоль) і DIEA (1,4мкл, 0,0046ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 10мм амоній форміат і ацетонітрил і одержуючи вказану сполуку у вигляді олії (1,1мг, 30%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 490, 526, 1488 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1527 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1dd Синтез сполуки 18c. До розчину сполуки 17c (6,5мг, 0,0065ммоль) і сполуки 3 (5,5мг, 0,0097ммоль) в 5% метанолі в дихлорметані (0,5мл) додають НВТУ (3,7мг, 0,0097ммоль) і DIEA (3,4мкл, 0,0194ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і очищають залишок методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 30% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії (4мг, 30%). РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 1532 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1554 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1570 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.2 Методологія синтезу дуокарміциновмісного пептидного лінкера без саморуйнівного спейсера



1.2a Реакція А: Через суспензію алкілуючого ядра (7мг) в 2мл етилацетату пропускають повільний потік сухого газоподібного HBr до одержання прозорого розчину, що займає приблизно 15хв. Реакційну суміш концентрують і сушать протягом ночі у високому вакуумі.

1.2b Реакція В: До суспензії бромметилсекосполуки, одержаної на стадії А, в ДМФА додають EDC (10мг, 0,054ммоль) і 5-нітробензофуранкарбову кислоту (12мг, 0,054ммоль) і залишають перемішуватись протягом 6 годин. Потім до даної реакційної суміші додають етилацетат і насичений розчин солі. Об'єднані органічні шари концентрують після трьох екстракцій етилацетатом і фільтрують через силікагель, використовуючи суміш $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$ при збільшенні кількості MeOH . Продукт підтверджують методом мас-спектрометрії, $M+1=530$.

1.2c Реакція С: Вводять захист на 4'-ОН, використовуючи метилпіпіразинкарбонілхлорид (11мг, 0,054ммоль) в 2мл ДХМ, 200мкл алілового спирту і піридин (21мкл) протягом 2 годин. Продукт очищують методом колонкової хроматографії на силікагелі та ідентифікують методом мас-спектрометрії, $MS+1=654$.

1.2d Реакція D: Відновлення нітрогрупи виконують за допомогою гідрування над Pd/C в суміші

ДХМ/ MeOH (2:1) при тиску 40 фунт на кв. дюйм протягом 45хв.

Продукт фільтрують і фільтрат концентрують і сушать у високому вакуумі. Продукт підтверджують методом мас-спектрального аналізу MS^{+1} і переносять на наступну стадію без додаткового очищення.

1.2e Реакція Е: До розчину описаної вище сполуки (18мг, 0,024ммоль) в суміші $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$ (2:1, 3мл) додають Fmoc-Val-цитрулін (29мг, 0,06ммоль), одержану суміш перемішують протягом 10хв. до розчинення всієї кислоти. Додають 15мг, 0,06ммоль EEDQ і перемішують реакційну суміш в темряві протягом ночі. Потім реакційну суміш концентрують, ополіскують діетиловим ефіром і залишок очищують препаративною ВЕРХ зі зворотною фазою, одержуючи продукт, який ідентифікують методом мас-спектрометрії $M+1=1103$.

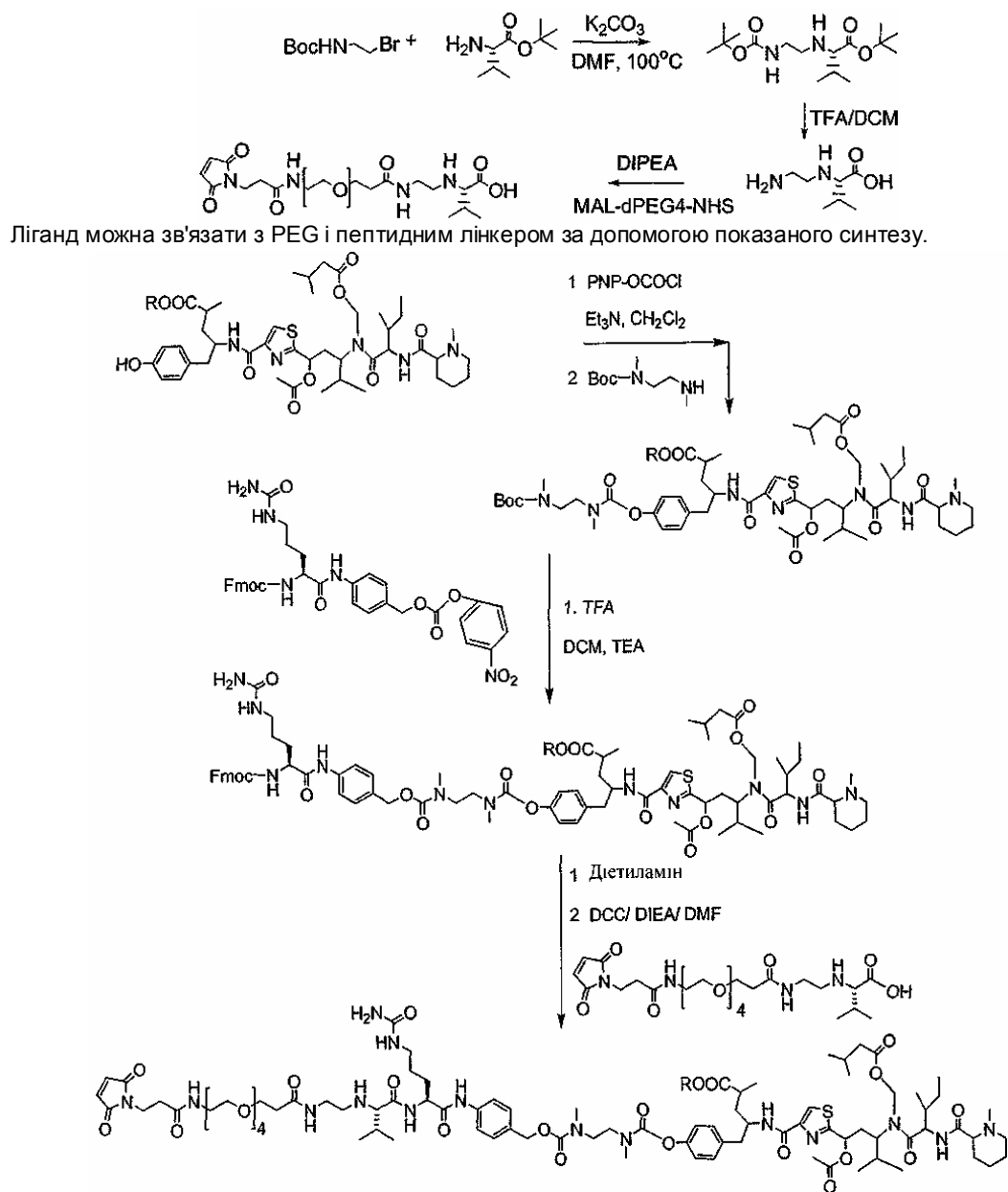
1.2f Реакція F: Видалення захисної групи Fmoc виконують, використовуючи 5% піпіридин в 1мл ДМФА протягом 10хв. Після концентрування реакційної суміші твердий залишок ополіскують діетиловим ефіром. Продукт підтверджують методом мас-спектрального аналізу, $MS+1=880$ і $M+K=919$.

1.2g Реакція G: До розчину вільного аміну в ДМФА (1,5мл), одержаного на стадії F, додають Mal-(PEG)₄-NHS-ефір (20мг) і реакційну суміш пе-

ремішують протягом 1 години. Концентрування з подальшим очищенням методом препаративної ВЕРХ зі зворотною фазою дає 2,8мг сполуки (загальний вихід 11%, виходячи з алкілуючого ядра),

які підтверджують методом мас-спектрального аналізу, $MC+1=2178$, $M+Na=1300$ і $M+K=1316$.

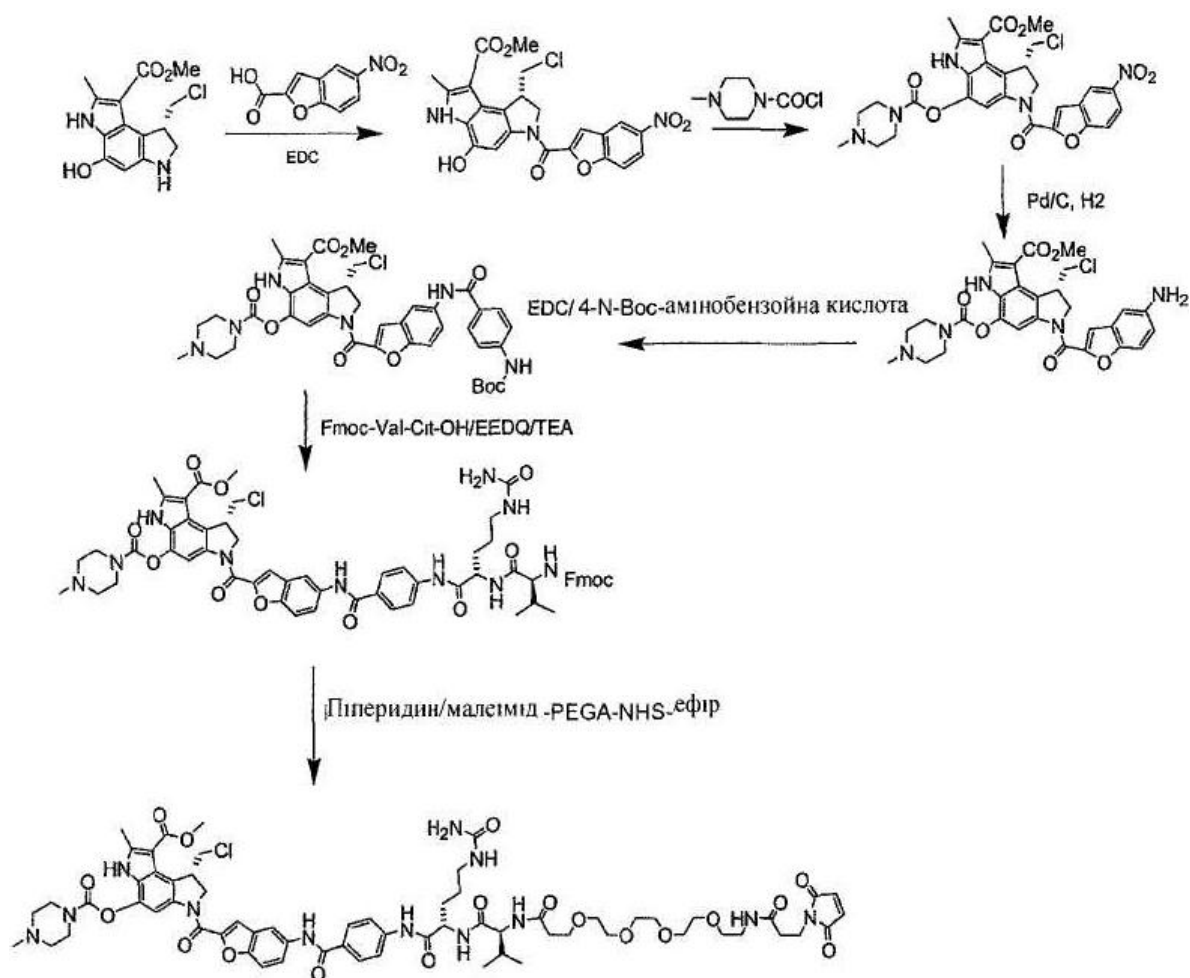
1.3 Синтез пептидного лінкера, кон'югованого з тубулізином А



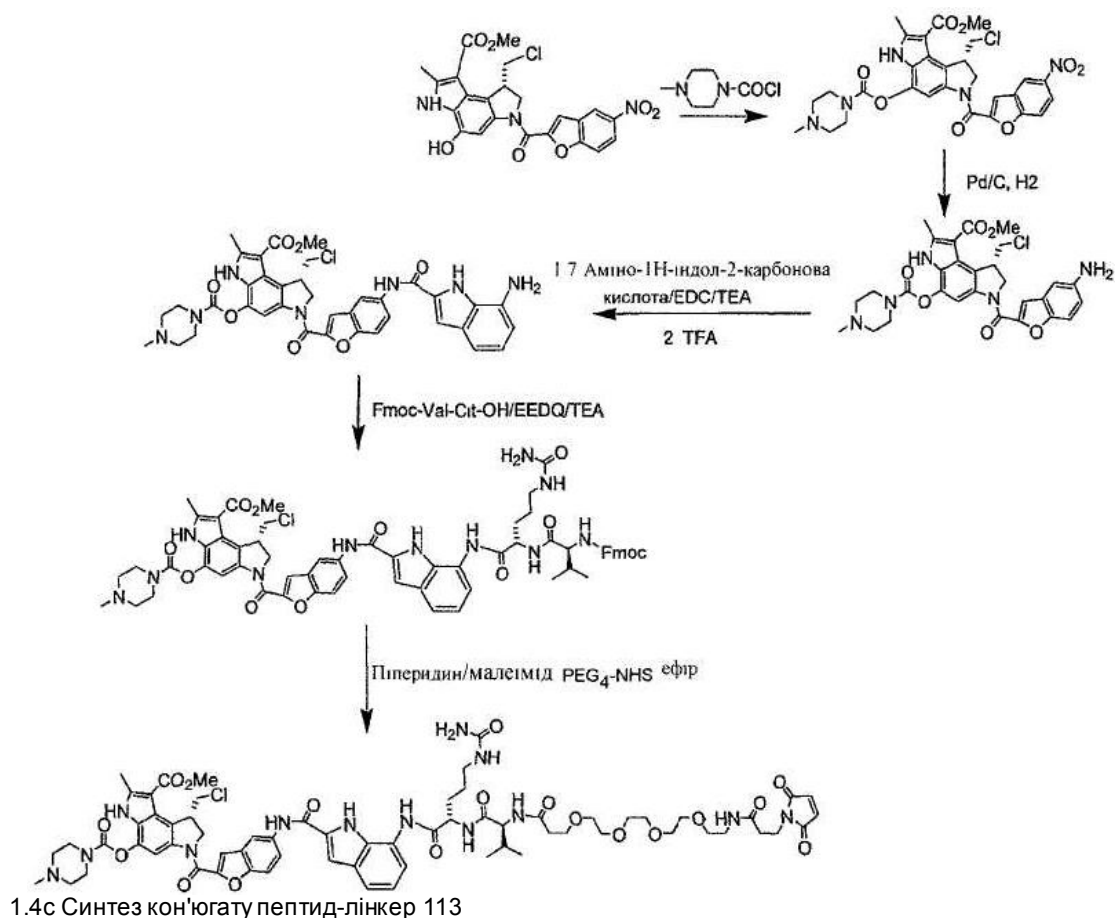
Синтез проміжних продуктів і кон'югату ліганд-ліки, що має пептидний лінкер, де ліки являють

собой тубулізин А, показаний тут вище. Цей основний спосіб можна використати з іншими ліками.

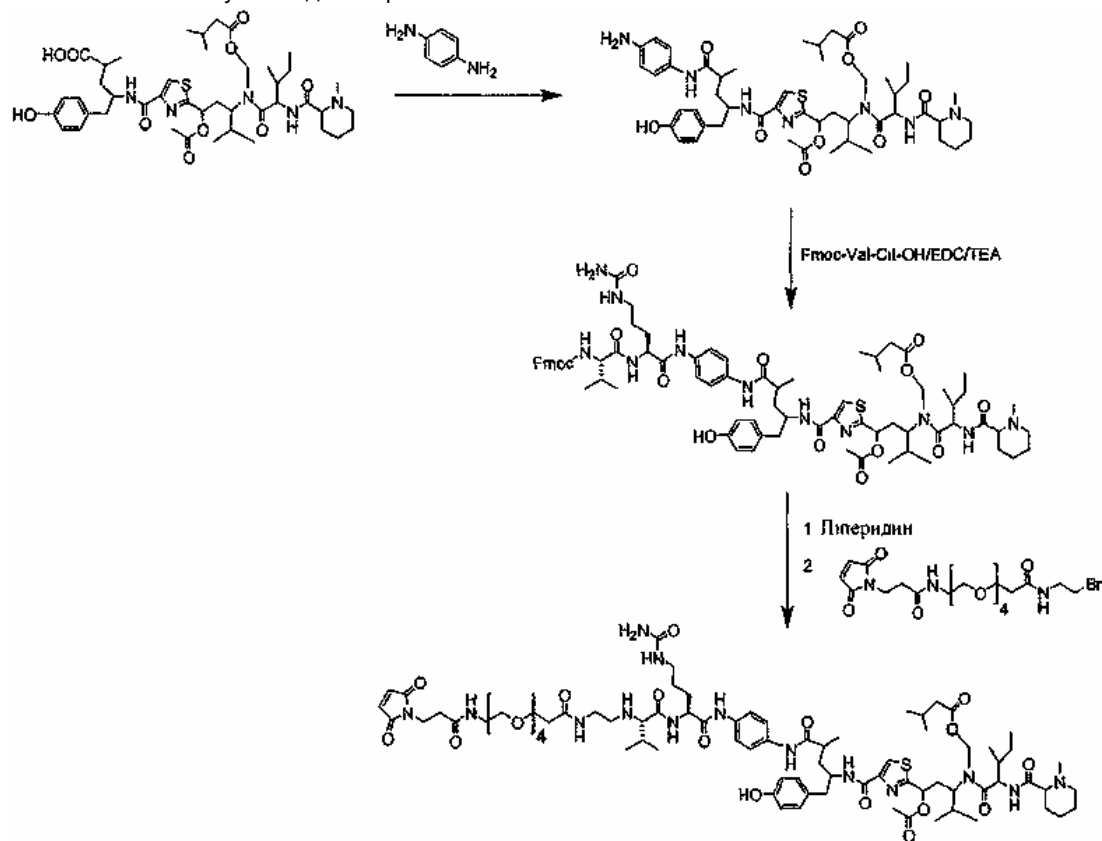
1.4a Синтез кон'югату пептид-лінкер 111

**111**

1.4b Синтез кон'югату пептид-лінкер 112



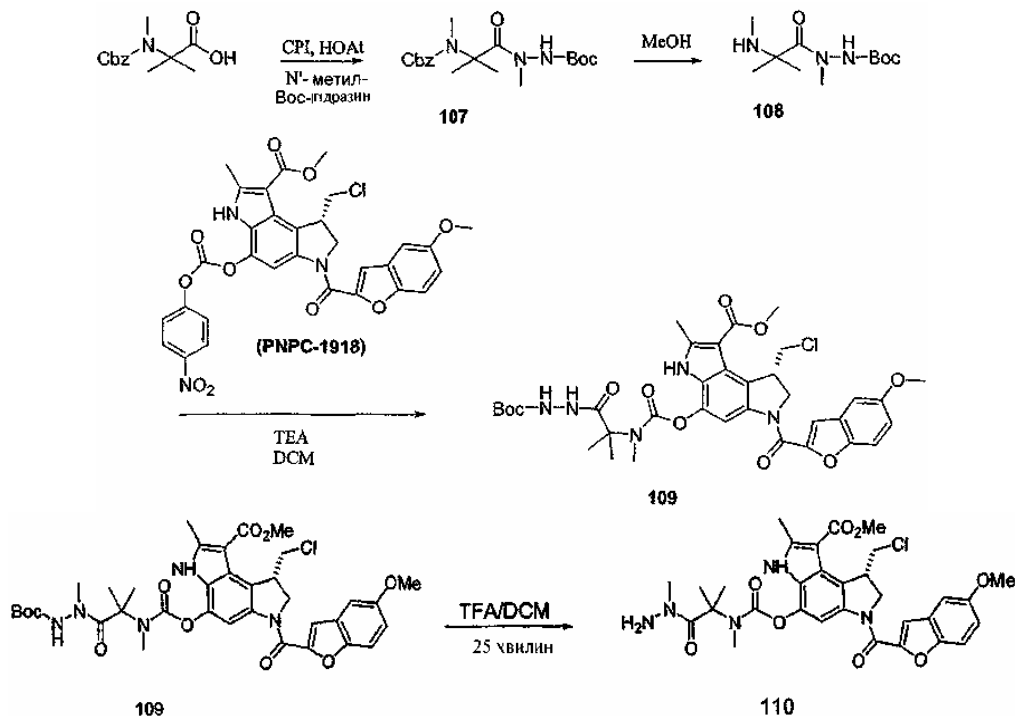
1.4с Синтез кон'югату пептид-лінкер 113



Приклад 2: Синтез 6-членних кон'югатів з гідразинівим лінкером

2.1 Синтез 6-членного гем-диметильного гідразинівого лінкера, кон'югованого з дуокарміциновим похідним цитотоксиком

2.1a Схема синтезу сполуки 109

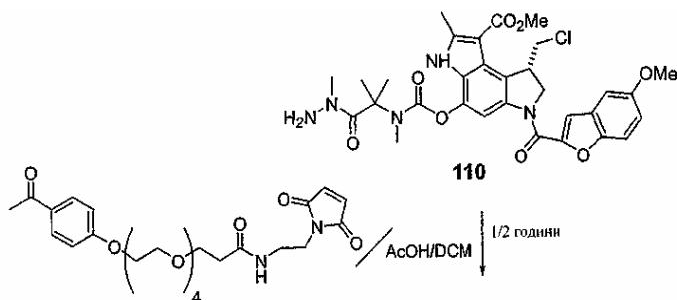


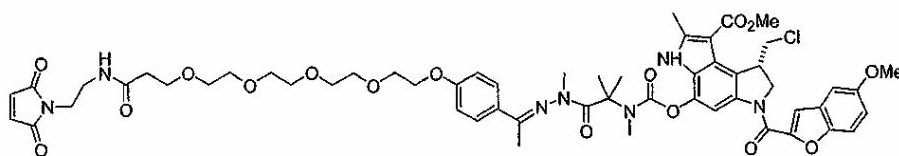
2.1b Синтез сполуки 110

До суспензії Cbz-диметилаланіну (1г, 3,98ммоль) в 30мл ДХМ при температурі бані з льодом додають HOAT (каталітичний, 0,25екв.), DIPEA (2,8мл, 16ммоль), а потім 2-хлор-1,3-диметилімідазолідиний гексафторфосфат (CPl) (1,2г, 4,4ммоль). Потім до даної реакційної суміші додають Вос-NN(Me) (643моль, 4,4ммоль). Реакційну суміш залишають перемішуватись протягом ночі при кімнатній температурі. До реакційної суміші додають 10% розчин лимонної кислоти (100мл) і екстрагують ДХМ. Органічну фазу промивають водою і потім насиченим розчином бікарбонату натрію, а потім знов водою. Потім органічну фазу концентрують і очищають на колонці з силікагелем з підвищенням полярності етилацетату в гексані, одержуючи 860мг, 57% вихід сполуки 107, яку ідентифікують методом мас-спектрометрії, $M+1=380$ і $M+NH_4^+=397$.

Захисну групу Cbz видаляють каталітичним гідролізом, використовуючи Pd/C в MeOH і одержуючи сполуку 108, яку підтверджують методом MS.

До розчину PNPC-1918 (10мг, 0,1ммоль) в 2мл ДХМ додають по краплі розчин сполуки 108 (60мг, 0,25ммоль) в 8мл ДХМ і залишають реакційну суміш перемішуватись протягом 2 днів до повного зникнення вихідної речовини. Реакційну суміш фільтрують через невелику набивку з силікагелю і потім концентрують і очищають методом препаративної ВЕРХ зі зворотною фазою, одержуючи 4,2мг сполуки 109. Продукт ідентифікують методом мас-спектрометрії, $M+1=740$. Видалення Вос-захисту зі сполуки 109 виконують за допомогою чистого ТФА протягом 20хв., одержуючи сполуку 110. Продукт ідентифікують методом мас-спектрометрії, $M+1=640$.





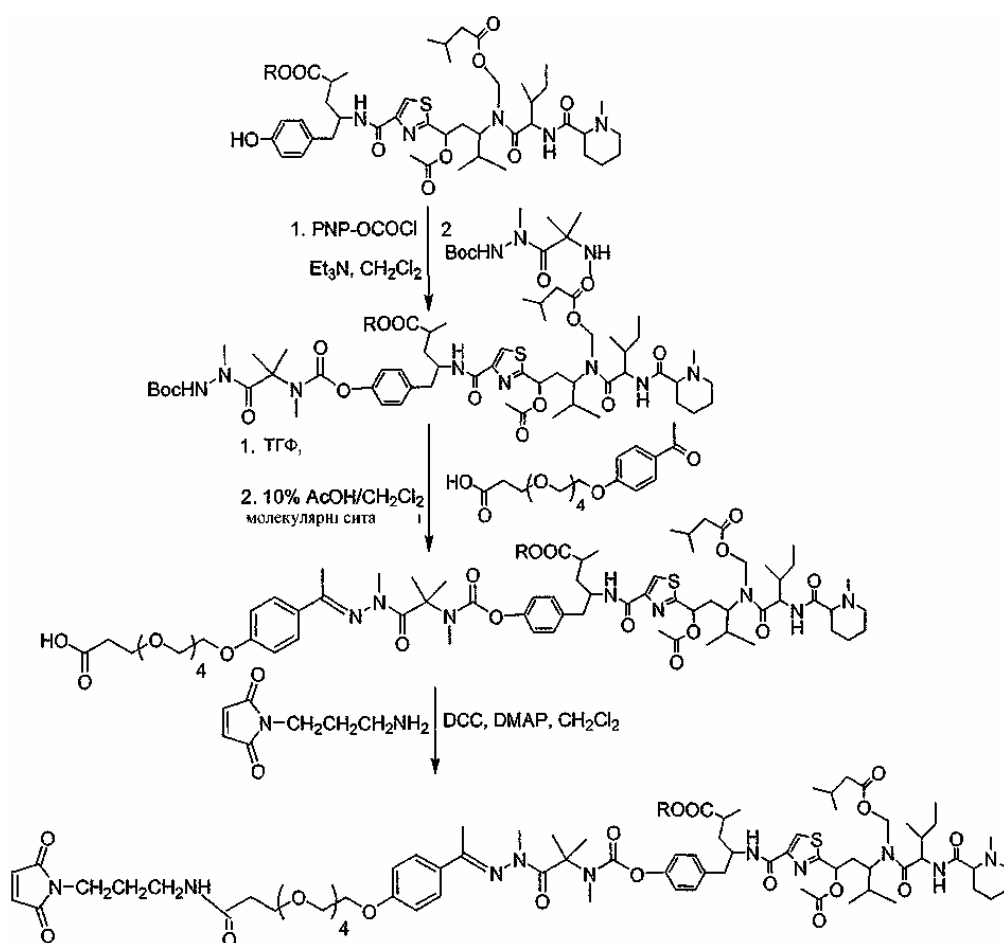
111

2.1с Синтез сполуки 111

Ma1-PEG₄-ацетофенон і сполуку 110 (3мг, 0,005ммоль) об'єднують, концентрують і сушать протягом ночі у високому вакуумі. До даної суміші додають 1мл 5% розчину оцтової кислоти, приготованого за день до цього, і сушать над молекулярними ситами. Утворення гідрозону завершується менше ніж за годину. Після чого реакційну суміш

концентрують і очищують методом препаративної ВЕРХ зі зворотною фазою (амоній форміат $\text{pH}=7$), одержуючи 2,8 мг сполуки 111 (60% вихід). Продукт ідентифікують методом мас-спектрометрії, $M+1=1129$. $M+\text{NH}_4=1146$ і $M+\text{K}=1168$.

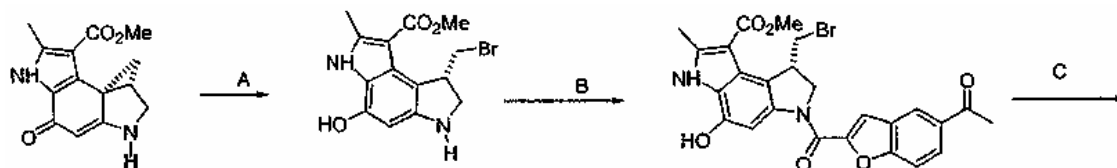
2.2 Синтез гем-диметильного 6-членного гідразинового лінкера, кон'югованого з тубулізиновим ЦИТОТОКСИНОМ

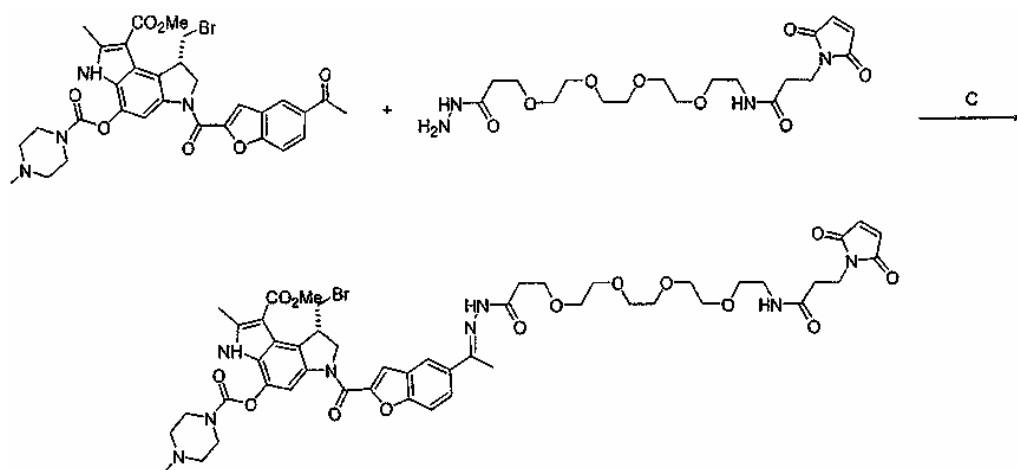


Методологію, аналогічну показаній у прикладі 2.1, можна застосувати до синтезу гемінально-диметильного 6-членного підразиногові лінкера,

який утворює комплекс з ліками, такими як тубулі-
зин А.

2.3 Синтез підразинового лінкера, кон'югованого з аналогом дуокарміцину





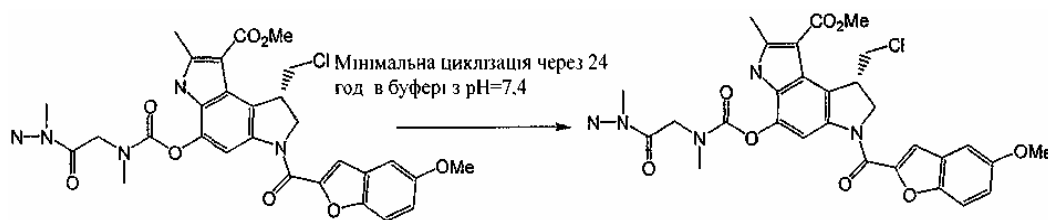
До розчину бромметилсеко-сполуки (0,074ммоль) в 3мл ДМФА додають 5-актиліндол-2-карбоксилат (30мг, 0,15ммоль) і EDC (28мг, 0,15ммоль) і одержану суміш перемішують протягом ночі. Реакційну суміш концентрують і очищують хроматографічно на силікагелі, використовуючи 5% MeOH в ДХМ і одержуючи 29мг (74% вихід) продукту, який підтверджують методом мас-спектрометрії, $M+1=523$.

До розчину сполуки, синтезованої на стадії С, в 5мл ДХМ і 300мкл алілового спирту додають метилпіперазинкарбонілхлорид (22мг, 0,11ммоль) і піридин (44мкл). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 5 годин. Концентрування з подальшим очищенням методом хроматографії на силікагелі з використанням як елюенту суміші 5% MeOH/ДХМ дає 48мг необхідного продукту (73% вихід). Продукт підтверджують методом мас-спектрометрії, $M+1=650$.

Розчин описаної вище сполуки (8,2мг, 0,012ммоль) і Ma1-PEO₄-гідразину в 5% оцтовій кислоті в безводному ДХМ перемішують при кімнатній температурі протягом 20хв., а потім випаровують розчинник і проводять препаративну ВЕРХ зі зворотною фазою, використовуючи ацетонітрил і водну фазу з амонійформіатним буфером, одержуючи 2,5мг необхідного кінцевого продукту, які підтверджують методом мас-спектрометрії, $M+1=1063$.

2.4а Швидкість циклізації диметильного 6-членного гідразинового лінкера

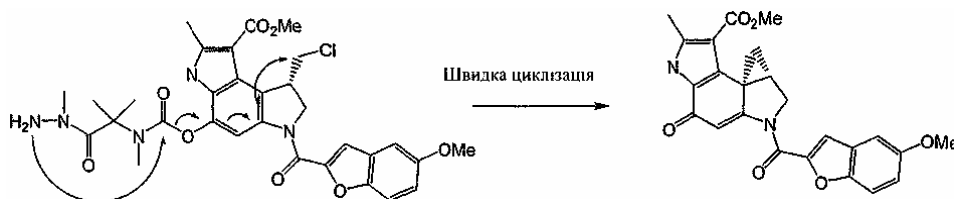
Дуокарміциновий аналог, кон'югований з диметильним 6-членным гідразиним лінкером, інкубують в буфері при pH7,4 протягом 24 годин і досліджують у часі утворення циклізованого продукту, що виходить внаслідок циклізації гідразинового лінкера, який вивільняє при цьому дуокарміциновий аналог.



Мінімальні кількості циклізованого продукту детектують через 24 години при pH=7,4, це показує, що даний вид 6-членного гідразинового лінкера демонструє відносно низьку швидкість циклізації.

2.4b Швидкість циклізації гем-диметильного 6-членного гідразинового лінкера

Дуокарміциновий аналог, кон'югований з гем-диметильним 6-членным гідразиним лінкером інкубують в буфері при pH7,4 і досліджують у часі утворення циклізованого продукту, що виходить внаслідок циклізації гідразинового лінкера, який вивільняє при цьому дуокарміциновий аналог.

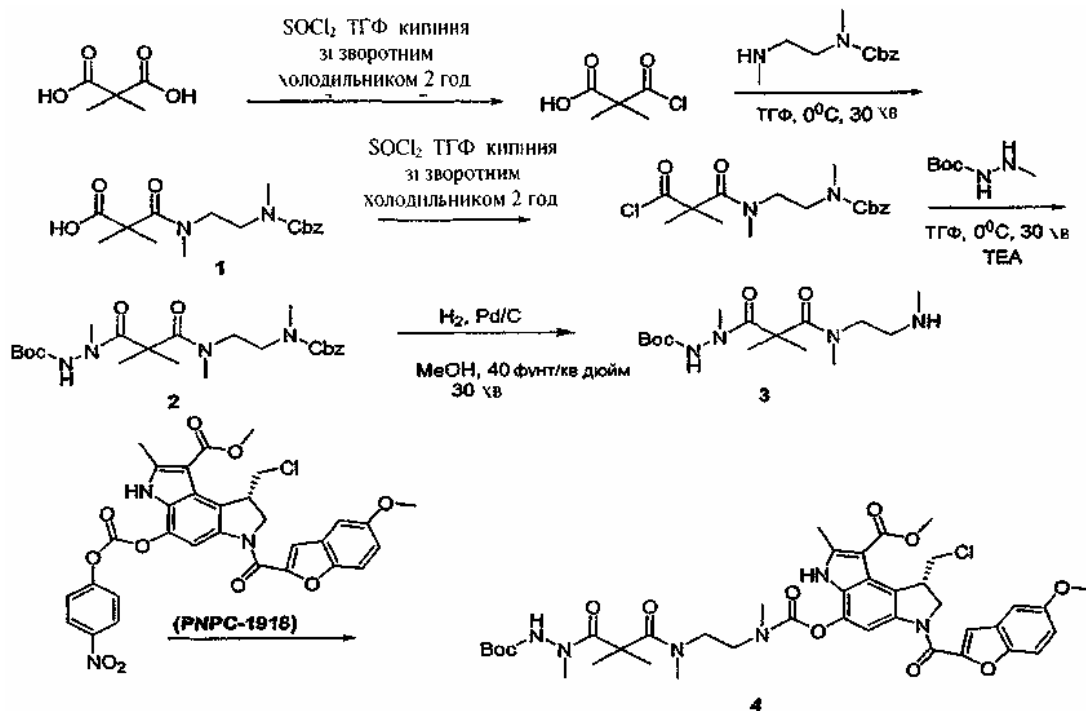


За наявності 6-членного гем-диметильного лінкера реакція циклізації є досить швидкою, протікаючи до завершення за декілька хвилин. Таким чином, швидкість циклізації для гем-диметильного 6-членного гідразинового лінкера значно більше,

ніж швидкість для 6-членного лінкера, що не містить гем-диметильного фрагмента.

ПРИКЛАД 3: Синтез кон'югатів з 5-членным гідразиновим лінкером

3.1 Методологія синтезу сполуки 4



Cbz-DMDA-2,2-диметилмалонова кислота (1)
До розчину 2,2-диметилмалонової кислоти (2,0мг, 0,0151моль) додають тіонілхлорид (1,35мл, 0,0182моль) в ТГФ (15мл) в колбі на 25мл, оснащений мішалкою, датчиком температури і зворотним холодильником, додають краплю ДМФА і нагрівають реакційну суміш при кипінні зі зворотним холодильником протягом 2 годин, потім охолоджують до кімнатної температури. Дану реакційну суміш переносять по краплі до розчину Cbz-DMDA (4мг, 0,0182моль) і триетиламіну (4мл, 0,0287моль) в ТГФ (5мл) при 0°C і перемішують протягом 30хв. при даній температурі. Розчинник видаляють у вакуумі і залишок розчиняють в 1н HCl (50мл) і екстрагують ДХМ ($2 \times 25\text{мл}$). Об'єднані органічні шари екстрагують 1н NaOH ($2 \times 25\text{мл}$) і об'єднаний водний шар підкисляють ($\text{pH} < 1$) концентрованою HCl і екстрагують EtOAc ($2 \times 25\text{мл}$), сушать над MgSO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі до липкої твердої речовини брудно-білого кольору, 3,44мг, 68% вихід. Сполуку 1 підтверджують методом МС: m/z 337,0 $[\text{M}+1]^+$.

ВЕРХ час утримання: 3,77хв. (мас-спектрометрія).

Cbz-DMPA-2,2-диметилмалоновий-Вос-N'-метилгідразин (2)

До розчину сполуки 1 (3,0мг, 0,0089моль) і тіонілхлориду (0,78мл, 0,0107моль) в ТГФ (25мл) в тригорлій RBF на 50мл, забезпеченій мішалкою, датчиком температури і зворотним холодильником, додають краплю ДМФА і реакційну суміш ки-

п'ятьять зі зворотним холодильником протягом 2 годин, потім охолоджують до кімнатної температури. Потім додають дану реакційну суміш по краплі до розчину Вос-N-метилгідразину (1,33мг, 0,091моль) і триетиламіну (3мл, 0,0215моль) в ТГФ (25мл) при 0°C і перемішують протягом 30хв. Розчинник видаляють у вакуумі і залишок розчиняють в EtOAc (50мл), сушать над MgSO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі до олії коричневого кольору. Дану олію розчиняють в EtOAc і очищують методом колонкової хроматографії (100% EtOAc), одержуючи 3,45мг, 83% вихід прозорої олії. Сполуку 2 підтверджують методом МС: m/z 465,2 $[\text{M}+1]$.

ВЕРХ час утримання: 3,97хв. (мас-спектроскопія).

РМРА-2,2-Диметилмалоновий-Вос-N'-метилгідразин (3)

До розчину сполуки 2 (0,5мг, 0,0011моль) в MeOH (30мл) додають 10% Pd/C (15мг) і реакційну суміш залишають для гідрювання в апараті Пара на 30хв. Каталізатор відфільтровують і фільтрат концентрують у вакуумі до прозорої олії масла, одержуючи сполуку 3 (0,38мг). Продукт підтверджують методом ЯМР (^1H , CDCl_3) δ : 1,45 (1, 15H), 2,45 (с, 3H) 2,85 (с, 6H), 3,16 (с, 3H) 4,64 (м, 1H) 10,6 (ш.с, 1H); ЯМР (^{13}C , CDCl_3): 24,1, 28,57, 35,15, 35,58, 36,66, 47,01, 48,51, 81,11, 155,17, 173,56, 176,24.

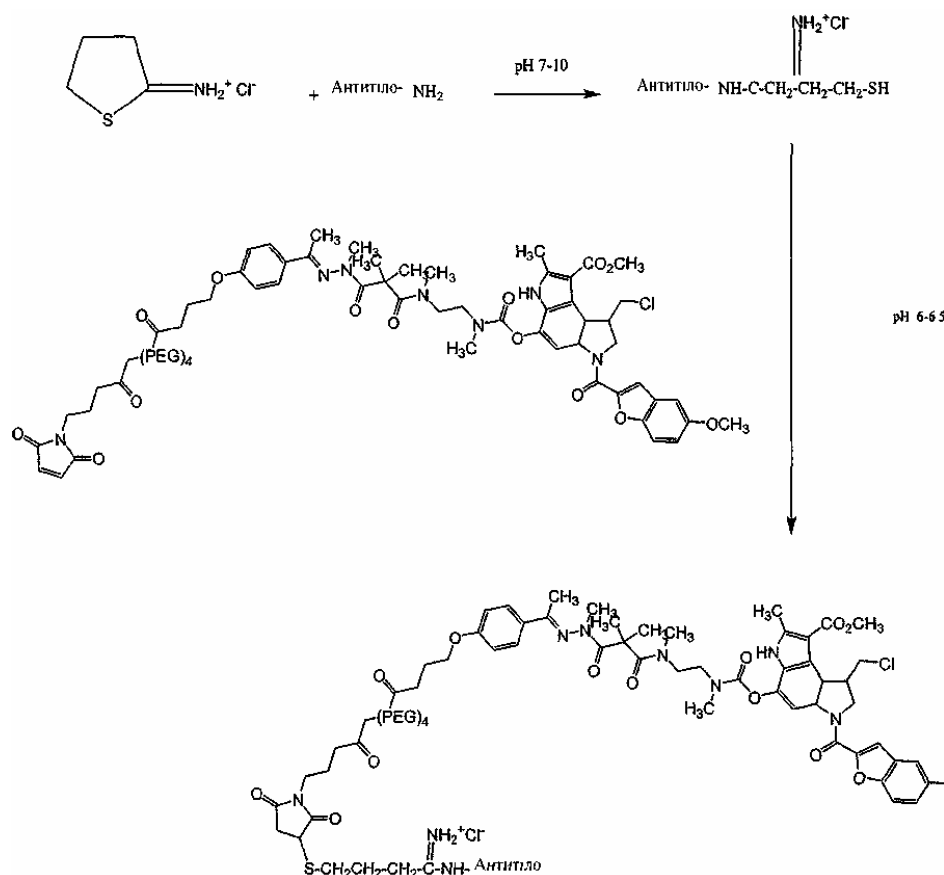
Синтез сполуки 4

В RBF на 15мл, оснащений мішалкою, об'єднують сполуку 3 (50мг, 0,1513ммоль), PNPC-1918 (20мг, 0,0315ммоль) і ДХМ (5мл). Розчин перемішують протягом 30хв., потім додають триетиламін (25мкл, 0,1794ммоль) і перемішують розчин світло-жовтого кольору протягом 1 години. Даний розчин концентрують у вакуумі до олії жовтого кольору і очищають методом колонкової хроматографії (від 100% ДХМ до суміші 1:1 EtOAc/ДХМ), одержуючи

сполуку 4 у вигляді твердої речовини брудно-білого кольору (22мг, 84% вихід). Продукт підтверджують методом мас-спектрометрії: m/z 825,7 $[M+1]^+$.

ВЕРХ час утримування: 7,65хв. (мас-спектрометрія)

3.2 Синтез кон'югату антитіло-ліки, що має 5-членний гідразинівий лінкер



Дана схема демонструє кон'югацію антитіла з комплексом лінкер-ліки. Такі методології добре відомі у фармацевтичній галузі. Приклади інших реакційноздатних сайтів включають малеїміди, галогенацетаміди, які взаємодіють з тіолами на ліганді, тіоли, які взаємодіють з дисульфідами на

ліганді, гідразиди, які взаємодіють з альдегідами і кетонами на ліганді, і гідроксисукциніміди, ізоціанати, ізотіанати і ангідриди, які взаємодіють з аміногрупою на ліганді.

Приклад 4: Синтез кон'югатів з дисульфідними лінкерами

Схема 1

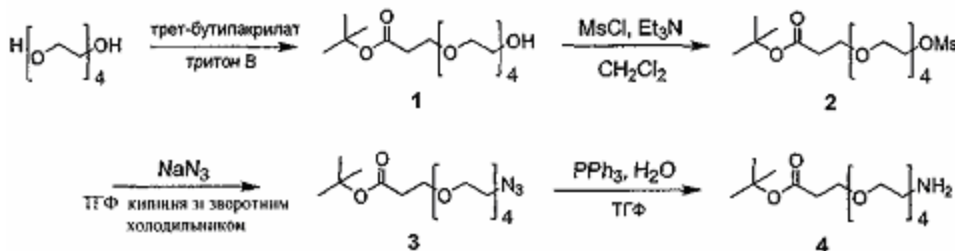


Схема 2

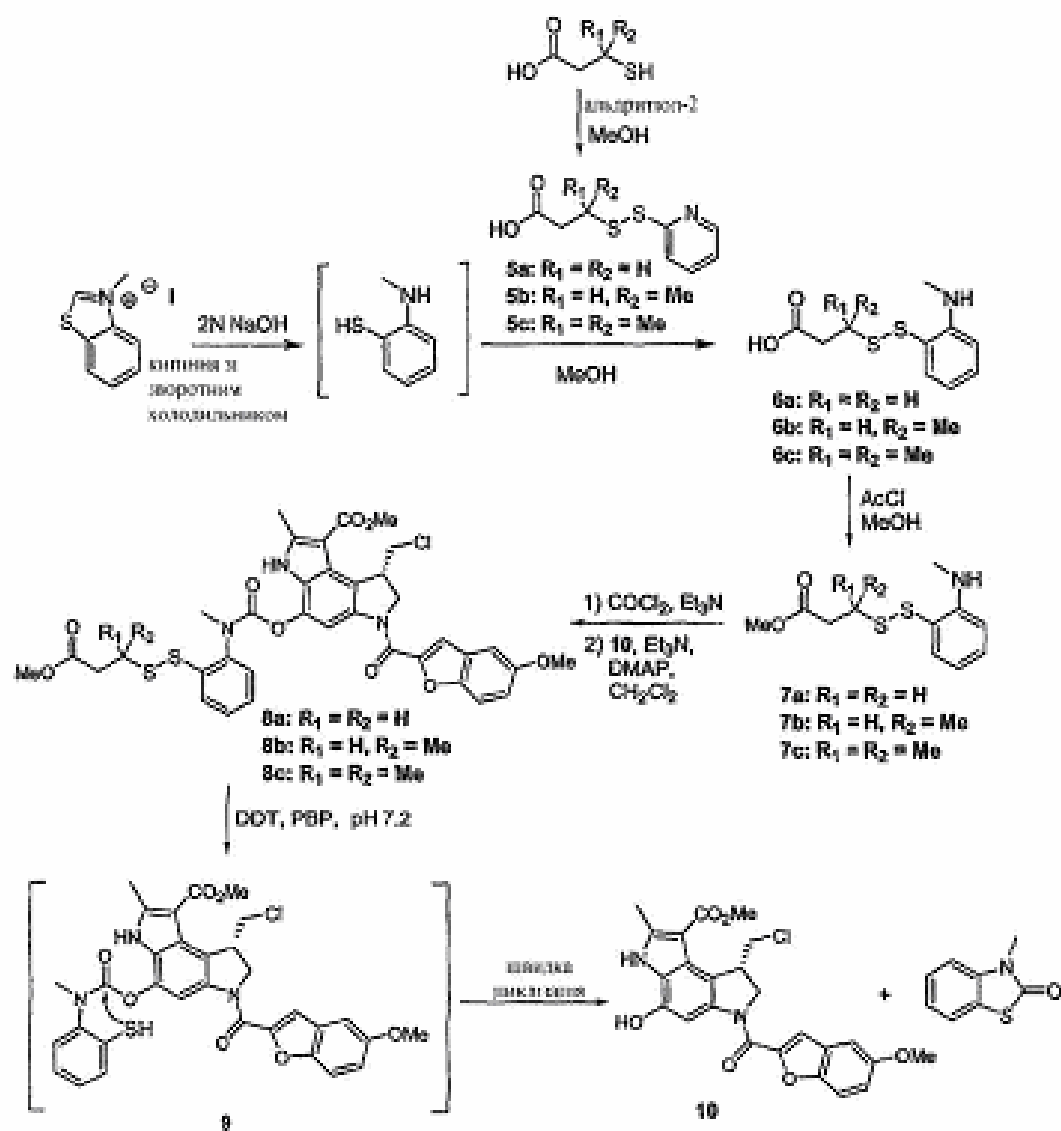
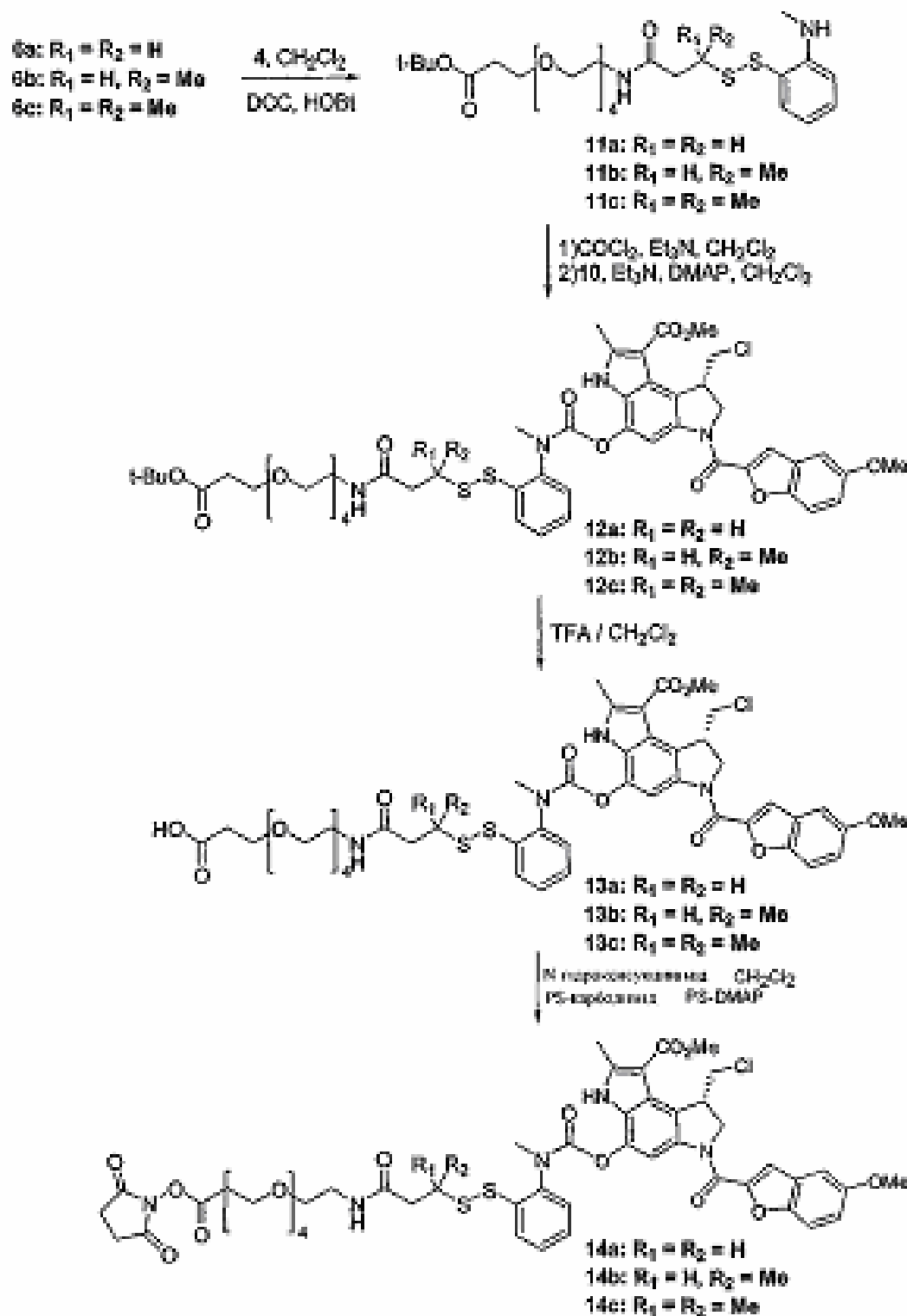


Схема 3



4.1a Синтез сполуки 1. В колбу, що містить PEG4 (3,88г, 20ммоль), додають тритон В (40% розчин в метанолі, 1,08мл, 0,25ммоль) і через 15хв. трет-бутилакрилат (3,62мл, 24ммоль). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом

ночі. Суміш концентрують у вакуумі і залишок очищують методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку

сполуку у вигляді безбарвної олії (2,35г, 36%). ^1H ЯМР δ : 1,45 (с, 9H), 2,5 (т, 2H), 3,65 (м, 18H).

4.1b Синтез сполуки 2. До розчину сполуки 1 (1,17г, 3,6ммоль) в дихлорметані (10мл) додають триетиламін (532мкл, 4ммоль) і метансульфонілхлорид (309мкл, 4ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (1,3г, 89%). ^1H ЯМР δ : 1,43 (с, 9H), 2,48 (т, 2H), 3,07 (с, 3H), 3,62-3,70 (м, 14H), 3,76 (м, 2H), 4,37 (м, 2H).

4.1c Синтез сполуки 3. До розчину сполуки 2 (1,3г, 3,25ммоль) в етанолі (10мл) додають азид натрію (423мг, 6,5ммоль). Одержану таким чином суміш кип'яють зі зворотним холодильником протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (1,01г, 90%). ^1H ЯМР δ : 1,45 (с, 9H), 2,50 (т, 2H), 3,40 (т, 2H), 3,62-3,73 (м, 16H).

4.1d Синтез сполуки 4. До розчину сполуки 3 (470мг, 1,35ммоль) в ефірі (5мл), що містить H_2O (25мкл), додають трифенілфосфін (391мг, 1,48ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (325мг, 75%). ^1H ЯМР δ : 1,45 (с, 9H), 2,24 (ш.с, 2H), 2,51 (т, 2H), 2,91 (т, 2H), 3,56 (м, 2H), 3,63-3,66 (м, 12H), 3,72 (м, 30 2H).

4.1e Синтез сполуки 5. До розчину 3-меркаптопропіонової кислоти (1,22г, 11,5ммоль) в метанолі (10мл) додають альдритол-2 (3,78г, 17,25ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3 години. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 30% етилацетат в гексані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії (2,44г, 98%). ^1H ЯМР δ : 2,8 (т, 2H), 3,05 (т, 2H), 7,14 (м, 1H), 7,67 (м, 2H), 8,48 (м, 1H).

Сполука 5b: ^1H ЯМР δ : 1,43 (д, 3H), 2,61 (м, 1H), 2,76 (м, 1H), 3,40 (м, 1H), 7,17 (м, 1H), 7,66 (м, 2H), 8,45 (м, 1H)

4.1f Синтез сполуки 6. 3-Метилбензотіазолий йодид (1г, 3,6ммоль) розчиняють в 2н водному розчині гідроксиду натрію (10мл) і суміш перемішують протягом 6 годин при 100°C, потім підкисляють 6н водним розчином соляної кислоти до pH 4 і екстрагують діетиловим ефіром. Органічний шар сушать над Na_2SO_4 , випаровують на ротаторному випарнику у вакуумі, залишок розчиняють в метанолі (10мл) і додають сполуку 5a (776мг, 3,6ммоль). Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години. Суміш концентрують досуха і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи

вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (482мг, 55%). ^1H ЯМР δ : 2,85 (м, 2H), 2,95 (м, 5H), 6,64 (м, 2H), 7,3 (м, 1H), 7,4 (дд, 1H); МС (електророзпилення) 244 ($\text{M}+\text{H}^+$), 487 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

Сполука 6b: ^1H ЯМР δ : 1,35 (д, 3H), 2,48 (м, 1H), 2,92 (с, 3H), 3,02 (м, 1H), 3,34 (м, 1H), 6,62 (м, 2H), 7,28 (м, 1H), 7,44 (м, 1H); МС (електророзпилення) 258 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Сполуки 6с: ^1H ЯМР δ : 1,45 (с, 6H), 2,70 (с, 2H), 2,93 (с, 3H), 6,62 (м, 2H), 7,24 (м, 1H), 7,51 (м, 1H); МС (електророзпилення) 272 ($\text{M}+\text{H}^+$), 294 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 310 ($\text{M}+\text{K}^+$).

4.1g Синтез сполуки 7. До розчину сполуки 6a (28мг, 0,115ммоль) в безводному метанолі (1мл) додають ацетилхлорид (13мкл, 0,173ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 10% етилацетат в гексані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії (24мг, 83%). ^1H ЯМР δ : 2,08 (м, 2H), 2,93 (с, 3H), 2,95 (м, 2H), 3,70 (с, 3H), 6,63 (м, 2H), 7,28 (м, 2H), 7,40 (м, 2H); МС (електророзпилення) 258 ($\text{M}+\text{H}^+$), 280 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 296 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Сполука 7b: ^1H ЯМР δ : 1,32 (д, 3H), 2,45 (м, 1H), 2,92 (с, 3H), 2,93 (м, 1H), 3,35 (м, 1H), 3,67 (с, 3H), 6,62 (м, 2H), 7,26 (м, 1H), 7,44 (м, 1H); МС (електророзпилення) 272 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Сполука 7с: ^1H ЯМР δ : 1,42 (с, 6H), 2,66 (с, 2H), 2,93 (с, 3H), 3,62 (с, 3H), 6,62 (м, 2H), 7,24 (м, 1H), 7,51 (м, 1H); МС (електророзпилення) 286 ($\text{M}+\text{H}^+$), 308 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 324 ($\text{M}+\text{K}^+$).

4.1h Синтез сполуки 8. До розчину сполуки 7a (24мг, 0,093ммоль) в дихлорметані (1мл) додають трифосген (28мг, 0,093ммоль) і триетиламін (37мкл, 0,28ммоль) при 0°C. Суміш перемішують протягом 1 години. Суміш концентрують досуха і залишок використовують на наступній стадії без додаткового очищення.

Сирий матеріал розчиняють в дихлорметані (1мл) і додають сполуку 8a (35мг, 0,074ммоль) і DMAP (23мг, 0,190ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (53мг, 76%). ^1H ЯМР δ : 2,70 (с, 3H), 2,74 (м, 2H), 3,06 (м, 2H), 3,34 (м, 1H), 3,35 і 3,36 (2с, 3H), 3,63 і 3,64 (2с, 3H), 3,86 (м, 1H), 3,88 (с, 3H), 3,93 і 3,94 (2с, 3H), 4,48 (м, 1H), 4,55 (м, 1H), 4,79 (м, 1H), 7,05 (м, 1H), 7,11 (м, 1H), 7,26-7,52 (м, 5H), 7,85 (д, 1H), 8,1 (ш.с, 1H), 8,98 і 9,08 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 753 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Сполука 8b: ^1H ЯМР δ : 1,38 (м, 3H), 2,52 (м, 1H), 2,69 (м, 3H), 2,79 (м, 1H), 3,33 (м, 1H), 3,37 (2с, 3H), 3,64 (м, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,84-3,90 (м, 1H), 3,93 (2с, 3H), 4,48 (м, 1H), 4,57 (м, 1H), 4,78 (м, 1H), 7,06 (м, 1H), 7,12 (м, 1H), 7,26-7,43 (м, 3H), 7,50 (м, 2H), 7,86 (м, 1H), 8,1 (ш.с, 1H), 8,99, 9,08, 9,13 і 9,22 (4с, 1H); МС (електророзпилення) 767 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Сполука 8с: ^1H ЯМР δ : 1,44 (м, 6H), 2,63 (д, 2H), 2,70 (с, 3H), 3,35 (м, 1H), 3,38 і 3,39 (2с, 3H), 3,63 і 3,64 (2с, 3H), 3,87 (м, 1H), 3,88 (с, 3H), 3,93 і 3,94 (2с, 3H), 4,48 (м, 1H), 4,55 (м, 1H), 4,79 (м, 1H), 7,05 (м, 1H), 7,12 (м, 1H), 7,31-7,39 (м, 3H), 7,49 (м, 2H), 7,89 (д, 1H), 8,1 (ш.с, 1H), 9,12 і 9,23 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 781 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4.1i Синтез сполук 9 і 10. До розчину сполуки 8а (0,1мг) в суміші PBS-буферний розчин (рН7,2)/метанол (300мкл, 2:1) додають 20мм розчин DTT (100мкл, 15екв.) і контролюють протікання реакції методом ВЕРХ. Взаємодія протікає дуже швидко для детектування, через декілька секунд реакція вже завершується, кількісно даючи продукт - сполука 10. Проміжний продукт реакції, сполуку 9, не детектують.

4.1j Синтез сполуки 11. До розчину сполуки 6а (66мг, 0,2ммоль) в дихлорметані (1мл) додають DCC (47мг, 0,22ммоль), HOBT (31мг, 0,22ммоль) і сполуку 4 (50мг, 0,2ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (70мг, 62%). ^1H ЯМР δ : 1,44 (с, 9H), 2,51 (т, 1H), 2,63 (т, 2H), 2,93 (д, 3H), 3,01 (т, 2H), 3,45 (м, 2H), 3,55 (м, 2H), 3,64 (м, 12H), 3,71 (т, 2H), 5,01 (ш.с, 1H), 6,38 (ш.т, 1H), 6,62 (м, 2H), 7,27 (м, 1H), 7,43 (дд, 1H). МС (електророзпилення) 491 ($\text{M}-56+\text{H}^+$), 513 ($\text{M}-56+\text{Na}^+$), 547 ($\text{M}+\text{H}^+$), 569 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Сполука 11b: ^1H ЯМР δ : 1,34 (д, 3H), 1,45 (с, 9H), 2,30 (м, 1H), 2,5 (т, 2H), 2,69 (м, 1H), 2,93 (д, 3H), 3,37-3,55 (м, 5H), 3,63 (м, 12H), 3,71 (т, 2H), 4,99 (ш.с, 1H), 6,13 (ш.т, 1H), 6,62 (м, 2H), 7,25 (м, 1H), 7,48 (дд, 1H). МС (електророзпилення) 505 ($\text{M}-56+\text{H}^+$), 527 ($\text{M}-56+\text{Na}^+$), 543 ($\text{M}-56+\text{K}^+$), 561 ($\text{M}+\text{H}^+$), 583 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Сполука 11с: 1,43 (с, 3H), 1,45 (с, 9H), 2,46 (с, 2H), 2,5 (т, 2H), 2,92 і 2,94 (2с, 3H), 3,33 (м, 2H), 3,47 (т, 2H), 3,63 (м, 12H), 3,70 (т, 2H), 6,06 (ш.т, 1H), 6,63 (м, 2H), 7,25 (м, 1H), 7,54 (д, 1H); МС (електророзпилення) 519 ($\text{M}-56+\text{H}^+$), 541 ($\text{M}-56+\text{Na}^+$), 575 ($\text{M}+\text{H}^+$), 597 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

4.1k Синтез сполуки 12: До суспензії сполуки 11а (20мг, 0,037ммоль) в дихлорметані (1мл) додають триетиламін (15мкл, 0,11ммоль) і 2н розчин фосгену в толуолі (55мкл, 0,11ммоль) при 0°C. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години. Суміш концентрують, залишок розчиняють в дихлорметані (1мл) і додають сполуку 10 (14мг, 0,030ммоль) і DMAP (9мг, 0,076ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент 1% метанол в дихлорметані і одержуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді олії жовтого кольору (23мг, 74%). ^1H ЯМР δ : 1,44 (с, 9H), 2,49 (т, 2H), 2,67 (м, 2H), 2,65 і 2,67 (2с, 3H), 3,07 (м, 2H), 3,33 (с, 3H), 3,40 (м, 3H), 3,51 (м, 2H), 3,60 (м, 12H), 3,69 (м, 2H), 3,87 (с, 3H), 3,92 (с, 3H), 3,93 і 5 (м, 1H), 4,52 (м, 2H), 4,78 (м, 1H), 6,65,

6,74 і 6,97 (3 широких т, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,12 (с, 1H), 7,29-7,42 (м, 3H), 7,50 (м, 2H), 7,87 (д, 1H), 8,10 і 8,15 (2ш.с, 1H), 9,79 і 9,58 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 986 ($\text{M}+\text{H}^+-56$), 1042 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Сполука 12b: ^1H ЯМР δ : 1,32 (м, 3H), 1,44 (с, 9H), 2,39 (м, 1H), 2,48 (м, 2H), 2,60 (м, 1H), 2,67 і 2,69 (2с, 3H), 3,32 і 3,35 (2с, 3H), 3,38-3,72 (м, 20H), 3,88 (с, 10 3H), 3,93 (с, 3H), 3,94 (м, 1H), 4,52 (м, 2H), 4,77 (м, 1H), 6,53, 6,67 і 6,72 (3ш.т, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,12 (с, 1H), 7,29-7,39 (м, 3H), 7,49 (м, 2H), 7,88 (д, 1H), 8,12 і 8,25 (2ш.с, 1H), 9,13, 9,36, 10,08 і 10,21 (4с, 1H); МС (електророзпилення) 1000 ($\text{M}+\text{H}^+-56$), 1056 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1078 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1084 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Сполука 12с: ^1H ЯМР δ : 1,30-1,42 (м, 3H), 1,44 (с, 9H), 2,45-2,52 (м, 4H), 2,69 і 2,72 (2с, 3H), 3,34 і 3,35 (2с, 3H), 3,39-3,72 (м, 19H), 3,88 (с, 3H), 3,925 і 3,93 (2с, 3H), 3,94 (м, 1H), 4,53 (м, 2H), 4,80 (м, 1H), 6,63 (м, 1H), 7,06 (дд, 1H), 7,13 (д, 1H), 7,25-7,39 (м, 3H), 7,50 (м, 2H), 7,89 (д, 1H), 8,10 і 8,27 (2ш.с, 1H), 9,99 і 10,191 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 1014 ($\text{M}+\text{H}^+-56$), 1070 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1108 ($\text{M}+\text{K}^+$).

4.11 Синтез сполуки 13. Сполуку 12а (23мг, 0,022ммоль) розчиняють в розчині трифтороцтової кислоти і дихлорметану (1мл, 1/1) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30хв. і концентрують, одержуючи продукт (21мг, 100%). ^1H ЯМР δ : 2,60 (т, 2H), 2,67 і 2,68 (2с, 3H), 2,75 (м, 2H), 3,07 (м, 2H), 3,34 (с, 3H), 3,38-3,64 (м, 21H), 3,76 (т, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,92 (с, 3H), 3,93 (м, 1H), 4,53 (м, 2H), 4,78 (м, 1H), 7,06 (д, 1H), 7,13 (с, 1H), 7,31-7,43 (м, 3H), 7,49 (м, 2H), 7,87 (д, 1H), 8,10 і 8,15 (2ш.с, 1H), 9,44 і 9,65 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 986 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1008 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1024 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Сполука 13b: ^1H ЯМР δ : 1,34 (м, 3H), 2,56 (м, 1H), 2,62 (м, 2H), 2,68 (м, 3H), 2,8 (м, 1H), 3,35-3,36 (2с, 3H), 3,40-3,70 (м, 18H), 3,77 (т, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,93 і 3,95 (2с, 3H), 3,94 (м, 1H), 4,54 (м, 2H), 4,79 (м, 1H), 7,07 (д, 2H), 7,13 (с, 1H), 7,30-7,42 (м, 3H), 7,49 (м, 2H), 7,88 (д, 1H), 8,11 і 8,25 (2 широких с, 1H), 9,22, 9,37, 9,80 і 9,92 (4с, 1H); МС (електророзпилення) 1000 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1022 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1038 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Сполука 13с: ^1H ЯМР δ : 1,30-1,45 (м, 6H), 2,54 (м, 2H), 2,61 (м, 2H), 2,68 і 2,69 (2с, 3H), 3,35-3,36 (2с, 3H), 3,40-3,70 (м, 17H), 3,77 (т, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,92 і 3,93 (2с, 3H), 3,94 (м, 1H), 4,50 (м, 2H), 4,80 (м, 1H), 7,08 (м, 2H), 7,12 (д, 1H), 7,29-7,39 (м, 3H), 7,49 (м, 2H), 7,89 (м, 1H), 8,10 і 8,25 (ш.с 1H), 9,88 і 10,04 (2с, 1H); МС (електророзпилення) 1014 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1036 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1054 ($\text{M}+\text{K}^+$).

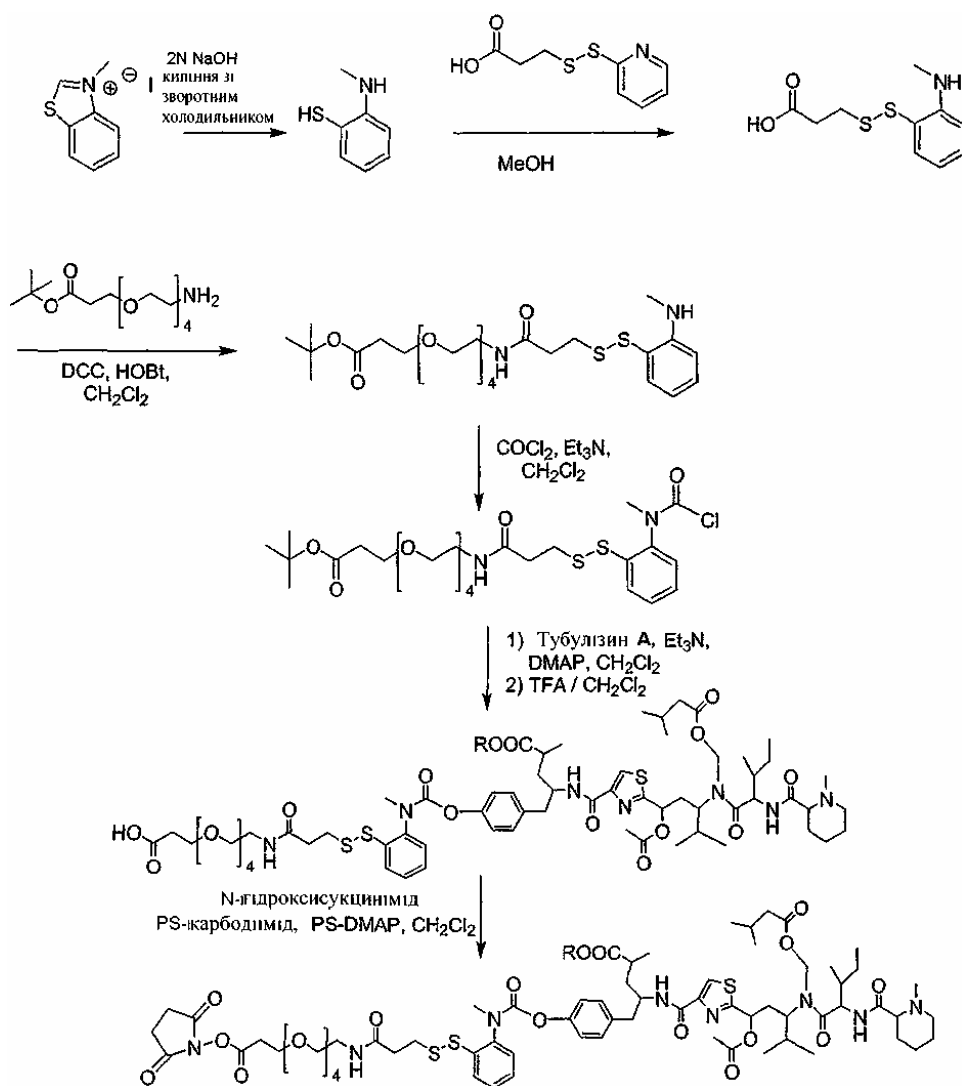
4.1m Синтез сполуки 14а. До розчину сполуки 13а (5,4мг, 0,0054ммоль) в дихлорметані (1мл) додають PS-карбодіімід (11,5мг, 0,04ммоль/г, 0,0108ммоль) і PS-DMAP (7,2мг, 1,49ммоль/г, 0,0108ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі, фільтрують і концентрують, одержуючи продукт. МС (електророзпилення) 1082 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4.2 Синтез дисульфідного лінкера, кон'югованого з тубулізином А

175

85716

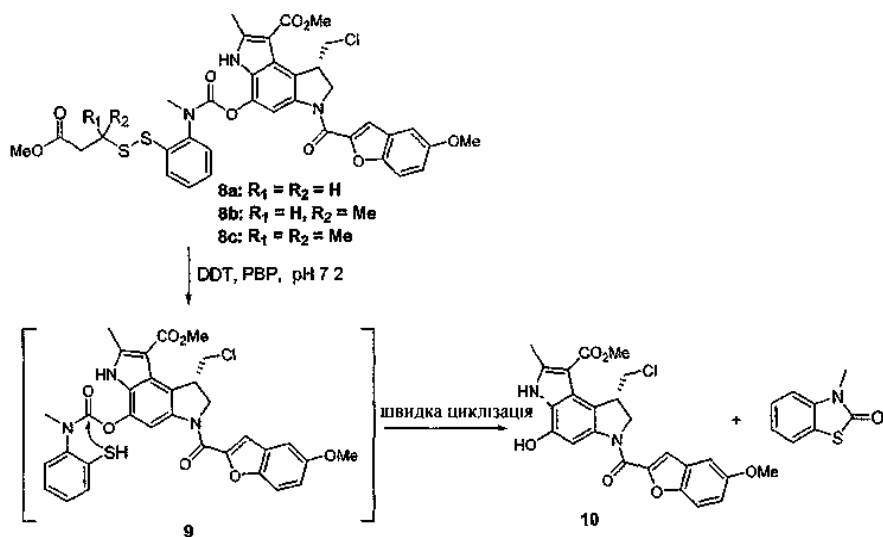
176



Ліки тубулізин А можна кон'югувати з дисульфідним лінкером за даним винаходом, застосовуючи показаний тут вище механізм. Використовуючи

чи аналогічні реакційні схеми, можна синтезувати інші ліки та інші лінкери за даним винаходом.

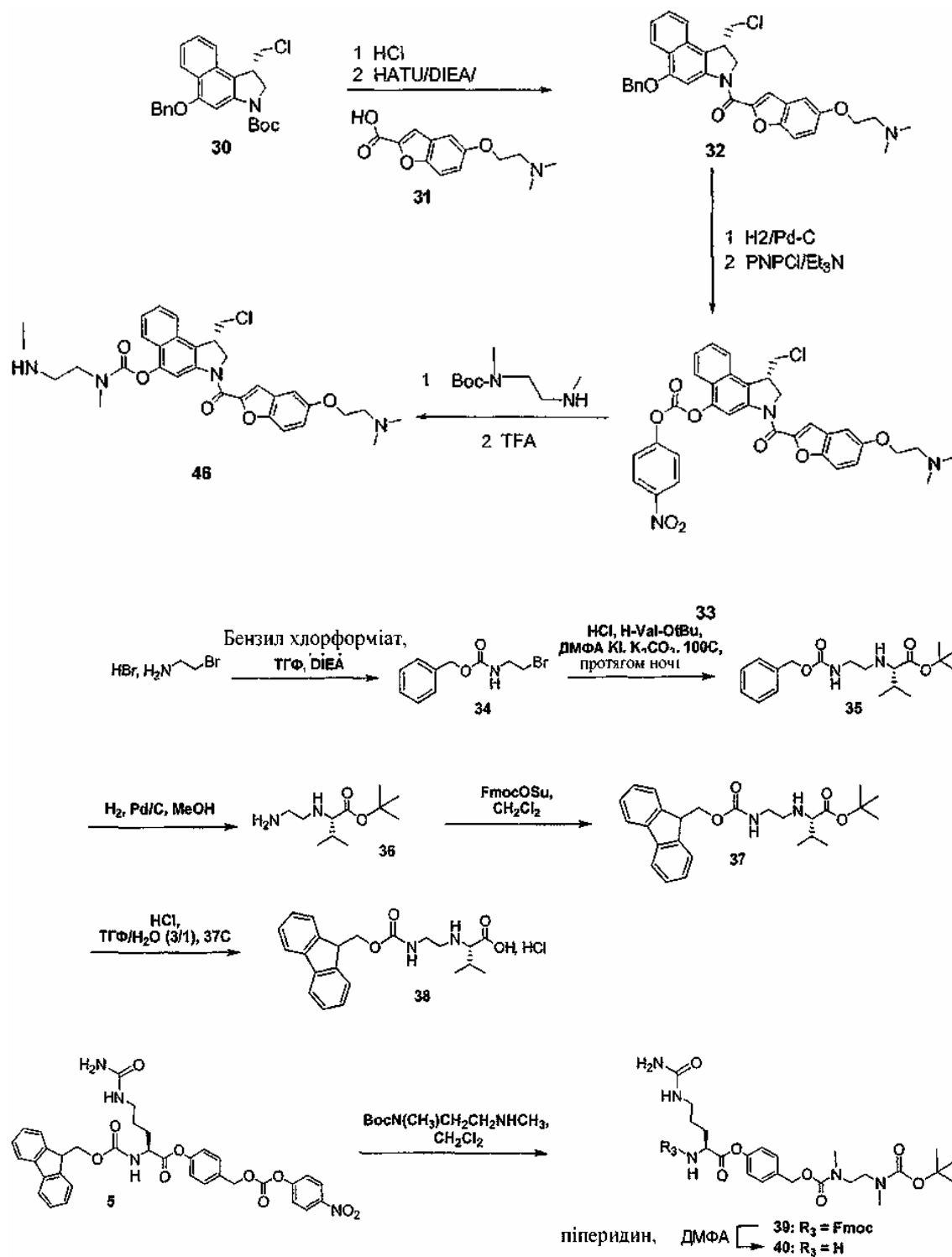
4.3 Швидкість циклізації дисульфідного лінкера

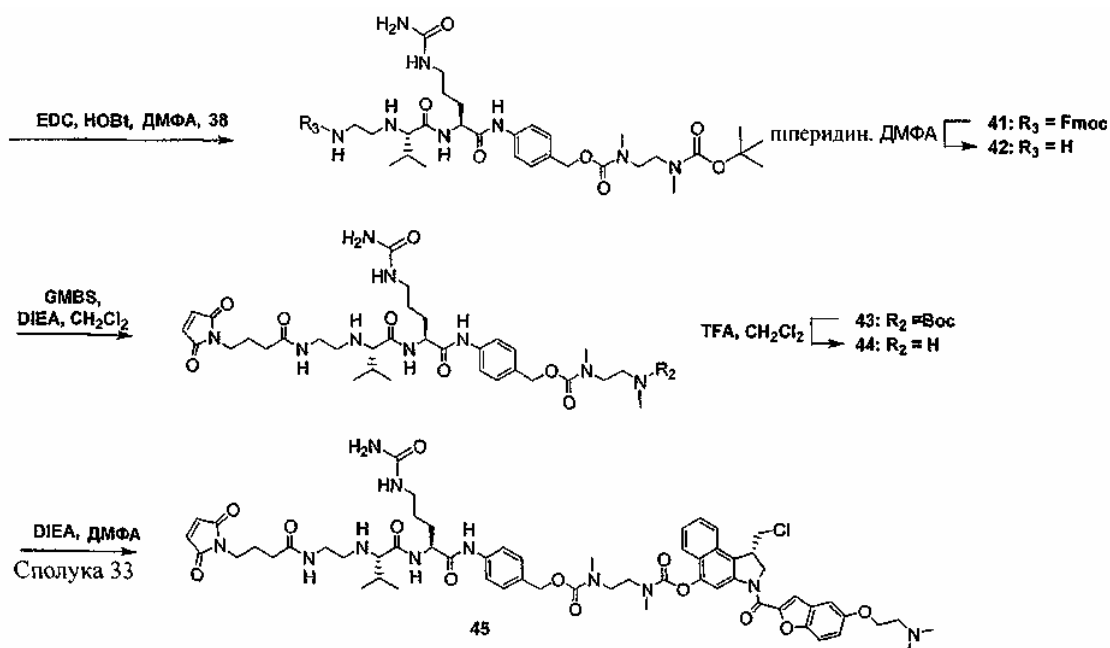


До розчину сполуки 8a (0,1мг) в суміші PBS-буферний розчин (pH7,2)/метанол (300мкл, 2/1) додають 20мм розчин DTT (100мкл, 15екв.) і контролюють протікання реакції методом ВЕРХ. У реакційній суміші відбувається швидка циклізація,

реакція завершується за декілька секунд, кількісно даючи продукт 10. Проміжний продукт реакції 9 не детектують.

Приклад 5





Синтез сполуки 32. Через розчин сполуки 30 (120мг, 0,28ммоль) в етилацетаті (10мл) барботують газоподібний HCl протягом 5хв. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі ще 30хв. і потім концентрують. Додають до реакційної суміші ефір і збирають осад білого кольору на фільтрувальній лінійці. Тверду речовину сушать протягом ночі у вакуумі, одержуючи 100мг необхідного продукту, які підтверджують методом РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 324 (M+H⁺) і використовують на наступній стадії без додаткового очищення. До розчину даної сполуки (100мг, 0,24ммоль) в ДМФА (5мл) додають сполуку 31 (65мг, 0,26ммоль), НАШ (100мг, 0,26ммоль) і TEA (91мкл, 0,52ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Розчинник випаровують і залишок очищають методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 0,1% ТФА у воді і ацетонітрил і одержуючи сполуку 32 у вигляді олії (110мг, 80%). Необхідний продукт підтверджують методом РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 555 (M+H⁺).

Синтез сполуки 33. Перемішують розчин сполуки 32 (110мг, 0,2ммоль), паладій на вугіллі (20мг) в ДХМ (10мл) і метанол (5мл) в атмосфері водню при атмосферному тиску і кімнатній температурі протягом 12 годин. Паладій відфільтровують, реакційну суміш концентрують і залишок очищають методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 0,1% ТФА у воді і ацетонітрил і одержуючи необхідну сполуку у вигляді олії (80мг, 78%) РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 465 (M+H⁺). До розчину залишку (80мг, 0,17ммоль) в дихлорметані (10мл) і ТГФ (5мл) додають РNPCI (4-нітрофенілхлорформіат) (137мг, 0,68ммоль) і триетиламін (144мкл, 1,02ммоль) при 0°C. Одержану таким чином суміш перемішують протягом 30хв. при 0°C і потім при кімнатній температурі протягом 12 година. Дану реакційну суміш концентрують у вакуумі і осаджують залишок, використовуючи етиловий ефір (100мл), одержу-

ють сполуку 33 у вигляді твердої речовини жовтого кольору (90мг, 82%), яку сушать у вакуумі і підтверджують методом РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 631 (M+H⁺).

Синтез сполуки 46: До розчину сполуки 33 (60мг, 0,1ммоль) в дихлорметані (10мл) додають Вос-N,N-диметилетилдіамін (84мг, 0,38ммоль) і триетиламін (26мкл, 0,1ммоль) при кімнатній температурі. Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 12 година. Реакційну суміш концентрують у вакуумі і залишок осаджують, використовуючи етиловий ефір (100мл), одержують Вос-захищену сполуку 34, яку використовують на наступній стадії без додаткового очищення. Вос-захищену сполуку 34 розчиняють в 10мл ТФА і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 60хв. Дану реакційну суміш концентрують у вакуумі і залишок осаджують, використовуючи етиловий ефір (100мл), одержують сполуку 46 у вигляді твердої речовини жовтого кольору, яку сушать у вакуумі і підтверджують методом РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 631 (M+H⁺).

Синтез сполуки 34: До розчину 2-брометиламінброміду (5г, 24,4ммоль) в ДМФА (50мл) додають діізопропілетиламін (8,5мл, 48,8ммоль) і бензилхлорформіат (3,48мл, 24,4ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин. Реакційну суміш концентрують і залишок очищають методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент суміш етилацетат/гексан (3/7) і одержуючи необхідну сполуку 34 у вигляді олії (4г, 64%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ: 3,54 (ш.с, 2H), 3,61 (ш.с, 2H), 5,12 (с, 2H), 7,36 (м, 5H).

Синтез сполуки 35: До розчину сполуки 34 (3,34г, 12,99ммоль) і трет-бутилового ефіру валіну (3,27г, 15,59ммоль) в ДМФА (50мл) додають карбонат калію (5,39г, 38,97ммоль) і йодид калію (2,59г, 15,59ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при 100°C протягом ночі. Реакційну

суміш концентрують і залишок очищують методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент суміш етилацетат/гексан (2/8) і одержуючи необхідну сполуку 35 у вигляді олії (3,12г, 69%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ : 0,92 (м, 6H), 1,46 (с, 9H), 1,86 (м, 1H), 2,53 (м, 1H), 2,80 (м, 2H), 3,18 (м, 1H), 3,31 (м, 1H), 5,10 (с, 2H), 5,25 (ш.с, 1H), 7,36 (м, 5H); PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 296 (M+H-трет-бутил⁺), 352 (M+H⁺).

Синтез сполуки 36. Розчин сполуки 35 (3,4г, 9,72ммоль) і паладій на вугіллі (200мг) в метанолі (30мл) вміщують в атмосферу водню при атмосферному тиску і кімнатній температурі. Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин. Паладій відфільтровують і реакційну суміш концентрують досуха, одержуючи необхідну сполуку 36 у вигляді олії (2,1г, 98%)

Синтез сполуки 37. До розчину сполуки 36 (2,1г, 9,72ммоль) в дихлорметані (30мл) додають FmocOSu (складний ефір 9-флуоренілметоксикарбоніл-М-гідроксисукцин) (3,28г, 9,72ммоль) при 0°C. Одержану таким чином суміш перемішують протягом 2 годин при 0°C. Розчинник видаляють на роторному випарнику і залишок очищують методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент дихлорметан, потім 0,5% метанол в дихлорметані і в завершення 1% метанол в дихлорметані і одержуючи необхідну сполуку 37 у вигляді безбарвної олії (2,55г, 60%). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ : 0,95 (нечіткий т, 6H), 1,48 (с, 9H), 1,90 (м, 1H), 2,55 (м, 1H), 2,82 (м, 2H), 3,18 (м, 1H), 3,32 (м, 1H), 4,24 (м, 1H), 4,37 (м, 2H), 5,40 (ш.с, 1H), 7,30 (м, 2H), 7,39 (м, 2H), 7,60 (д, 2H), 7,75 (д, 2H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 383 (M+H-трет-бутил⁺), 440 (M+H⁺), 462 (M+Na⁺), 478 (M+K⁺).

Синтез сполуки 38. Через розчин сполуки 37 (177мг, 0,4ммоль) в суміші тетрагідрофуран-вода (3/1,8мл) барботують газоподібний HCl протягом 5хв. Реакційну суміш перемішують при 37°C протягом ночі, потім концентрують досуха, одержуючи необхідну сполуку 38 у вигляді твердої речовини (168мг, 98%), яку підтверджують методом PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 383 (M+H⁺), 405 (M+Na⁺), і використовують на наступній стадії без додаткового очищення. PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 383 (M+H⁺), 405 (M+Na⁺).

Синтез сполуки 39. До розчину сполуки 5 (525мг, 0,79ммоль) в ДМФА (5мл) додають N-Boc-N,N'-диметилетилендіамін (177мг, 0,94ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 30хв. Розчинник видаляють і залишок очищують методом флеш-хроматографії на силікагелі, використовуючи як елюент дихлорметан, потім 2% метанол в дихлорметані і на завершення 5% метанол в дихлорметані і одержуючи необхідну сполуку 39 у вигляді безбарвної олії (364мг, 65%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 1,39 (с, 9H), 1,56 (м, 2H), 1,70 (м, 1H), 1,82 (м, 1H), 2,70 і 2,82 (2с, 3H), 2,90 (с, 3H), 3,09 (м, 1H), 3,17 (м, 1H), 3,30-3,37 (м, 4H), 4,16 (т, 1H), 4,27 (м, 1H), 4,33 (д, 2H), 5,02 (ш.с, 2H), 7,24-7,36 (м, 6H), 7,51-7,65 (м, 4H), 7,74 (д, 2H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 618 (M+H-Boc⁺), 662 (M+H-

трет-бутил⁺), 718 (M+H⁺), 740 (M+Na⁺), 1435 (2M+H⁺).

Синтез сполуки 40. Сполуку 40 одержують, як описано вище для сполуки 17а, з 98% виходом. PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 396 (M+H-Boc⁺), 496 (M+H⁺), 517 (M+Na⁺), 533 (M+K⁺), 992 (2M+H⁺).

Синтез сполуки 41. До розчину сполуки 40 (138мг, 0,28ммоль) в ДМФА (4мл) додають сполуку 38 (110мг, 0,28ммоль), HOBt (36мг, 0,28ммоль) і EDC (1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіімідгідрохлорид (50мг, 0,28ммоль). Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищують методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 0,1% ТФА у воді і ацетонітрилі і одержуючи необхідну сполуку 41 у вигляді олії (178мг, 70%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 1,04 і 1,11 (2д, 6H), 4,0 (с, 9H), 1,58 (м, 2H), 1,77 (м, 1H), 1,88 (м, 1H), 2,24 (м, 1H), 2,72 і 2,84 (2с, 3H), 2,92 (с, 3H), 3,10-3,18 (м, 4H), 3,35-3,46 (м, 6H), 3,82 (д, 1H), 4,22 (т, 1H), 4,41 (м, 2H), 4,59 (м, 1H), 5,04 (ш.с, 2H), 7,28-7,40 (м, 6H), 7,55 (м, 2H), 7,63 (м, 2H), 7,78 (д, 2H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 760 (M+H-Boc⁺), 804 (M+H-трет-бутил⁺), 860 (M+H⁺), 882 (M+Na⁺), 899 (M+K⁺).

Синтез сполуки 42. Сполуку 42 одержують, як описано вище для сполуки 17а, з 98% виходом. PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 538 (M+H-Boc⁺), 582 (M+H-трет-бутил⁺), 638 (M+H⁺), 660 (M+Na⁺).

Синтез сполуки 43. До розчину сполуки 42 (23мг, 0,036ммоль) в дихлорметані (1мл) додають GMBS (складний ефір N-(малеїмідобутирилокси)-сукцинімід) (14мг, 0,05ммоль) і діізопропілетиламін (8,4мкл, 0,05ммоль) при 0°C. Суміш повільно нагрівають до кімнатної температури і продовжують перемішування ще 30хв. Розчинник випаровують і залишок очищують методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 0,1% ТФА у воді і ацетонітрилі і одержуючи необхідну сполуку 43 у вигляді олії (26мг, 79%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 1,06 і 1,12 (2д, 6H), 1,41 (с, 9H), 1,59 (м, 2H), 1,78 (м, 1H), 1,86-1,93 (м, 3H), 2,24 (м, 3H), 2,74 і 2,84 (2с, 3H), 2,93 (ш.с, 3H), 3,13-3,22 (м, 4H), 3,40-3,60 (м, 8H), 3,82 (д, 1H), 4,60 (м, 1H), 5,05 (ш.с, 2H), 6,80 (с, 2H), 7,32 (м, 2H), 7,57 (д, 2H), 8,78 (д, 1H) м.ч.; PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 703 (M+H-Boc⁺), 747 (M+H-трет-бутил⁺), 803 (M+H⁺), 825 (M+Na⁺), 841 (M+K⁺).

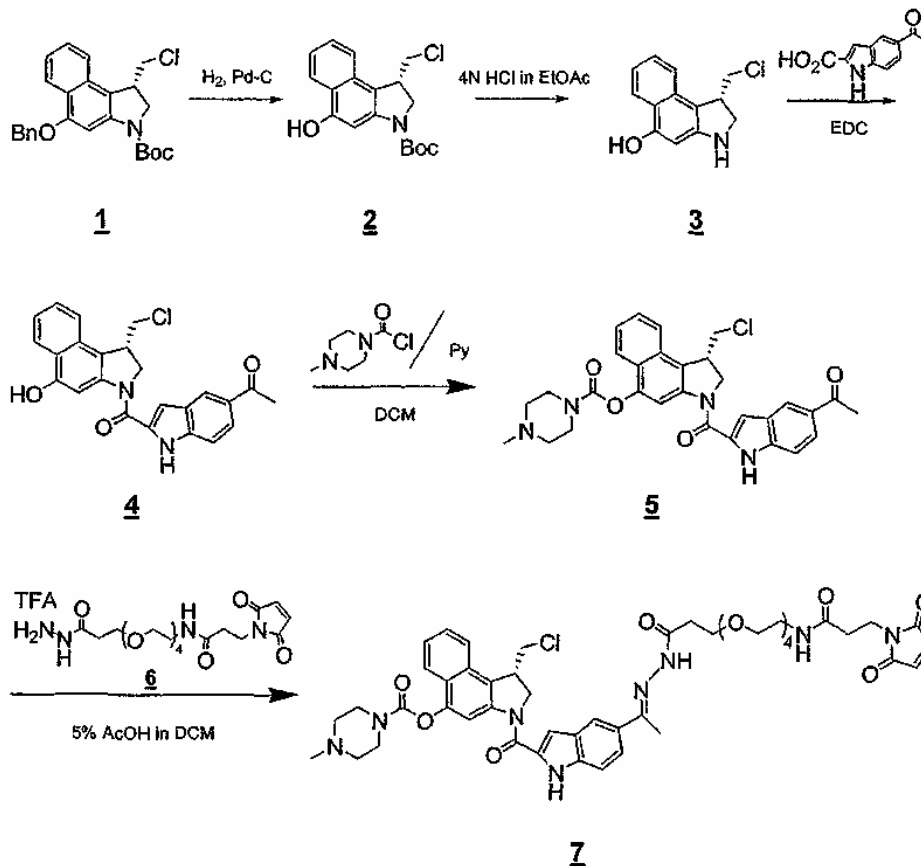
Синтез сполуки 44. Сполуку 44 одержують, як описано вище для сполуки 15а, з 98% виходом. PX-MC (іонізація з електророзпиленням) 703 (M+H⁺), 725 (M+Na⁺).

Синтез сполуки 45. До розчину сполуки 44 (15мг, 0,016ммоль) і сполуки 33 (10мг, 0,016ммоль) в ДМФА (0,8мл) додають діізопропілетиламін (5,5мкл, 0,032ммоль) при кімнатній температурі. Одержану таким чином суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випаровують і залишок очищують методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи як елюент 0,1% ТФА у воді і ацетонітрилі і одержуючи необхідну сполуку 45 у вигляді олії (10мг,

45%). ^1H ЯМР (CD_3OD) δ : 1,02-1,13 (м, 6H), 1,55 (м, 2H), 1,74 (м, 1H), 1,84-1,92 (м, 3H), 2,20-2,27 (м, 3H), 2,95-3,14 (м, 16H), 3,47-3,84 (м, 12H), 3,98 (м, 1H), 4,2-4,34 (м, 3H), 4,57 (м, 1H), 4,69 (м, 2H), 5,07-5,17 (м, 2H), 6,78 (с, 2H), 7,16-7,23 (м, 3H),

7,30 (м, 1H), 7,38-7,47 (м, 3H), 7,52-7,58 (м, 3H), 7,81-7,92 (м, 2H), 8,25 (ш.с, 1H) м.ч.; РХ-МС (іонізація з електророзпиленням) 1194 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1215 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1233 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Приклад 6



Синтез сполуки (2). Розчин сполуки 1 (100мг, 0,24ммоль) і 10% Pd-C (35мг) в суміші $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1/2, 10мл) дегазують у вакуумі протягом 40 сек. Одержану суміш вміщують в атмосфері водню і перемішують при 25°C протягом 7 годин. Дану реакційну суміш фільтрують через целіт (промивають CH_2Cl_2). Розчинник видаляють у вакуумі. Хроматографія на силікагелі з елюванням сумішшю EtOAc /гексан (2/8) дає сполуку 2 (77мг, 98%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ : 10,36 (с, 1H), 8,04 (д, 1H, $J=8,2\text{Гц}$), 7,72 (д, 1H, $J=8,2\text{Гц}$), 7,61 (ш.с, 1H), 7,45 (т, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,261 (т, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 4,06 (м, 4H), 3,73 (м, 1H), 1,52 (с, 9H).

Синтез сполуки (4). Розчин сполуки 2 (35мг, 0,1ммоль) в 4M HCl-EtOAc (5мл) перемішують при 25°C в атмосфері Ar протягом 30хв. Розчинник видаляють у вакуумі. До залишку додають 5-ацетиліндон-2-карбонову кислоту (24,4мг, 0,12ммоль). Додають розчин EDC (22,9мг, 0,12ммоль) в ДМФА (3мл) і реакційну суміш перемішують при 25°C протягом 5 годин. Розчинник видаляють. Сирий продукт хроматографують на силікагелі, елюючи 10% MeOH в CH_2CCl_2 і одержуючи сполуку 4 (40,7мг, 93%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ : 12,13 (с, 1H), 10,47 (с, 1H); 8,45 (с, 1H), 8,10 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,96 (ш.с, 1H), 7,85 (д, 2H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,54 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,51 (т, 1H, $J=8,2\text{Гц}$), 7,36 (т,

1H, $J=7,6$), 7,35 (с, 1H), 4,81 (т, 1H, $J=11,2\text{Гц}$), 4,54 (дд, 1H, $J=8,8\text{Гц}$), 4,23 (м, 1H), 4,01 (дд, 1H, $J=10,2\text{Гц}$), 3,86 (дд, 1H, $J=10,7\text{Гц}$), 2,61 (с, 3H).

Синтез сполуки (5). 4-Метил-1-піперазинкарбонілхлорид гідрохлорид (19,9мг, 0,1ммоль) додають до розчину сполуки 4 (20мг, 0,05ммоль) і безводного піридину (25мкл, 0,3ммоль) в 3% аліловому спирті в сухому метиленхлориді (4мл) і суміш перемішують протягом 16 годин. Очищення сирого продукту на силікагелі дає сполуку 5 (23,6мг, 91%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ : 12,03 (с, 1H), 8,41 (с, 1H), 8,21 (с, 1H), 8,01 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,88 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,82 (дд, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,58 (т, 1H, $J=8,1\text{Гц}$), 7,51 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 7,46 (т, 1H, $J=7,6\text{Гц}$), 7,37 (с, 1H), 4,86 (т, 1H, $J=10,8\text{Гц}$), 4,57 (дд, 1H, $J=10,8\text{Гц}$), 4,38 (м, 1H), 4,06 (дд, 1H, $J=10,8\text{Гц}$), 3,86 (дд, 1H, $J=11\text{Гц}$), 3,41 (широкий, 4H), 3,29 (широкий, 4H), 2,82 (с, 3H), 2,57 (с, 3H).

Синтез сполуки (7). Розчин сполуки 5 (13мг, 24ммоль) і лінкера 6 (16,9мг, 31ммоль) в 5% оцтовій кислоті в сухому метиленхлориді (1мл) перемішують протягом 30хв. при 25°C . Розчинник повністю видаляють у вакуумі і очищають методом ВЕРХ (колонка SymmetryPrep C_{18} , 7мкм, $19\times 150\text{мм}$), одержуючи сполуку 7 (18,5мг, 81%).

МС: розраховано для $C_{48}H_{57}ClN_8O_{11}$ (M+H) m/z 958,38, виявлено 958,10.

Приклад 7: Дослідження проліферації

Біологічну активність цитотоксичних сполук даного винаходу можна вивчати, використовуючи добре відоме дослідження проліферації з 3H -тимідином. Це зручний спосіб для кількісного визначення проліферації клітин, який оцінює синтез ДНК за допомогою визначення включення екзогенного радіоміченого 3H -тимідину. Дане дослідження є високо відтворюваним і може використовувати велику кількість сполук.

Для проведення дослідження клітини промієлоцитарного лейкозу HL-60 культивують в середовищі RPMI, що містить 10% фетальну сироватку теляти (FCS), дезактивовану нагріванням. У день дослідження клітини збирають, промивають і повторно суспендують при концентрації $0,5 \times 10^5$ клітин/мл в RPMI, що містить 10% FCS. 100 мкл клітинної суспензії додають в 96-лункові планшети. Виробляють серійне розведення (3-кратні інкременти) доксорубіцину (як позитивний контроль) або тестових сполук і додають по 100 мкл сполук на лунку. На завершення, додають 10 мкл 100 мкКю/мл 3H -тимідину на ямку та інкубують планшети протягом 24 годин. Збирають клітини в планшетах, застосовуючи 96-ямковий харвестер (Packard Instruments) і вимірюють на лічильнику Packard Top Count. Будують чотирьохпараметрові логістичні криві для включення 3H -тимідину як функції молярності ліків, використовуючи програмне забезпечення Prism для визначення величин IC_{50} .

Сполуки даного винаходу звичайно мають значення IC_{50} в описаному вище дослідженні приблизно від 1 нМ до 100 нМ, переважно приблизно від 10 нМ до 10 нМ.

Приклад 8: Кон'югація молекул ліки-лінкер з антитілами

Даний приклад описує умови взаємодії і методологію кон'югації молекули ліки-лінкер даного винаходу (що необов'язково включає інші групи, такі як спейсери, реакційноздатні функціональні групи і подібні) з антитілом як направляючим агентом X^4 . Дані умови і методологія, як передбачається, є тільки типовим прикладом, а не обмеженням. В даній галузі відомі інші підходи до кон'югації молекул ліки-лінкер з антитілами.

Описаний тут спосіб кон'югації оснований на введенні вільних тиольних груп в антитіло взаємодією лізину антитіла з 2-імінотіолоном з подальшою взаємодією молекули ліки-лінкер з активною малеїмідною групою. Спочатку у антитіла, що підлягає кон'югації, змінюють буфер на 0,1 М фосфатний буфер, pH 8,0, що містить 50 мм NaCl, 2 мм DTPA, pH 8,0 і концентрують до 5-10 мг/мл. Одержання тіолату здійснюють додаванням до антитіла 2-імінотіолану. Кількість 2-імінотіолану, що підлягає додаванню, визначають в попередніх експериментах і варіюють від одного антитіла до іншого. У попередніх експериментах проводять титрування, додаючи до антитіла зростаючі кількості 2-імінотіолану, з подальшою інкубацією з антитілом протягом однієї години при кімнатній температурі, антитіло висолують в 50 мм HEPES-буфер, pH 6,0,

використовуючи колонку Sephadex G-25, і швидко визначають кількість введених тиольних груп за допомогою взаємодії з дитіодипіридином (DTDP). Внаслідок взаємодії тиольних груп з DTDP відбувається вивільнення тіопіридину, яке контролюють при 324 нм. Використовують зразки з концентрацією білка 0,5-1,0 мг/мл. Для точного визначення концентрації білка в зразках визначають абсорбцію при 280 нм і потім аліквоту кожного зразка (0,9 мл) інкубують з 0,1 мл DTDP (5 мм вихідний розчин в етанолі) протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Також інкубують пусті зразки, що містять тільки буфер плюс DTDP. Через 10 хв. вимірюють поглинання при 324 нм і визначають кількість присутніх тіолів, використовуючи коефіцієнт екстинкції тіопіридину $19800 M^{-1}$.

Звичайно потрібна міра тіювання - три тиольні групи на антитіло. Наприклад, для одного конкретного антитіла цього досягають, додаючи 15-кратний молярний надлишок 2-імінотіолану з подальшою інкубацією при кімнатній температурі протягом 1 години. Отже, підлягаюче кон'югації антитіло інкубують з 2-імінотіолоном при необхідному молярному співвідношенні і потім висолують в кон'югаційний буфер (50 мм HEPES-буфер, pH 6,0, що містить 5 мм гліцин, 3% гліцерин і 2 мм DTPA). Тіолований матеріал витримують на льоду, поки визначають кількість введених тіолів, як описано вище.

Після перевірки кількості введених тиольних груп додають молекулу ліки-лінкер, що містить активну малеїмідну групу, з 3-кратним молярним надлишком на тиольну групу. Реакцію кон'югації проводять в кон'югаційному буфері, що містить також кінцеву концентрацію 5% диметилового ефіру етиленгліколю (або відповідного альтернативного розчинника). Звичайно вихідний розчин ліки-лінкер розчиняють в суміші 90% диметилового ефіру етиленгліколю і 10% диметилсульфоксиду. Для додавання до антитіла можна додавати вихідний розчин безпосередньо до тіолованого антитіла, яке має достатню кількість доданого диметилового ефіру етиленгліколю для доведення кінцевої концентрації до 5%, або заздалегідь розбавити в кон'югаційному буфері, що містить кінцеву концентрацію 10% диметилового ефіру етиленгліколю, з подальшим додаванням до рівного об'єму тіолованого антитіла.

Підлягаючу кон'югації реакційну суміш інкубують при кімнатній температурі протягом 2 годин при перемішуванні. Після інкубації реакційну суміш центрифугують при 14000 об./хв. протягом 15 хв. і доводять pH до 7,2, якщо відразу не проводять очищення. Очищення кон'югату проводять методом хроматографії, використовуючи ряд способів. Кон'югат можна очистити, застосовуючи метод розмір-виняткової хроматографії на колонці Sephacryl S200, заздалегідь урівноважений 50 мм HEPES-буфером, pH 7,2, що містить 5 мм гліцин, 50 мм NaCl і 3% гліцерин. Хроматографію виконують при лінійній швидкості потоку 28 см/год. Фракції, що містять кон'югат, збирають, об'єднують і концентрують. По-іншому, очищення можна провести методом іон-обмінної хроматографії. Умови варіюють від одного антитіла до іншого, і в кожно-

му випадку потрібна їх оптимізація. Наприклад, реакційну суміш кон'югату антитіло-ліки вносять в колонку SP-Sepharose, заздалегідь урівноважену в 50мм HEPES, 5мм гліцині, 3% гліцерині, рН6,0. Кон'югат антитіла елюють, використовуючи градієнт 0-1М NaCl у врівноважувальному буфері. Фракції, що містять кон'югат, об'єднують, доводять рН до 7,2 і, якщо потрібно, концентрують зразок.

Кожне з заявлених в патенті застосувань, патентів, публікацій та інших опублікованих документів, які були згадані або на які робились посилання в даному описі, включене тут у всій своїй повноті як посилання, в тій мірі, як якби було спеціально та індивідуально вказано, що кожне індивідуальне патентне застосування, патент, публікація та ін-

ший опублікований документ включені як посилання.

Притому що даний винахід описаний з посиланням на його специфічні варіанти, фахівець в даній галузі повинен розуміти, що можна робити різні зміни і заміни на еквіваленти, не відхиляючись від істинного духу і області даного винаходу і прикладеної формули винаходу. Крім того, можна виробити багато які модифікації для адаптації конкретної ситуації, матеріалу, композиції, що розглядається, способу, стадії або стадій процесу до мети, духу і області даного винаходу. Як передбачається, всі такі модифікації входять в область прикладеної формули винаходу.