



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120696** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

**C07D 487/04** (2006.01)

**C07D 519/00**

**A61K 47/50** (2017.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2013 10945</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Фішкін Нейтан (US), Міллер Майкл (US), Лі Вей (US), Сінгх Раджива (US)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>15.02.2012</b>	(73) Власник(и):	<b>ІМУНОГЕН, ІНК., 830 Winter Street Waltham, MA 02451, United States of America (US)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>27.01.2020</b>	(74) Представник:	<b>Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр. №177</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/443,062, 61/443,092, 61/483,499</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2010/091150 A1, 12.08.2010 EP 2 019 104 A1, 28.01.2009 WO 2011/106528 A1, 01.09.2011</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>15.02.2011, 15.02.2011, 06.05.2011</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US, US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>27.01.2020, Бюл.№ 2</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2012/025257, 15.02.2012</b>		

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОН'ЮГАТІВ

### (57) Реферат:

Даний винахід спрямований на способи одержання кон'югату агента, який зв'язується із клітинами, і лікарської речовини (наприклад цитотоксичної сполуки). Зазначені способи включають використання сполуки, здатної взаємодіяти з імінами, з метою забезпечення ефективного кон'югування цитотоксичних сполук з агентами, які зв'язуються з клітинами.

UA 120696 C2



## ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[01] Дана заявка, згідно з 35 USC § 119 (е), претендує на пріоритет дати подачі попередньої заявки США № 61/443062, поданої 15 лютого 2011 р., попередньої заявки США № 61/483499, поданої 6 травня 2011 р., і попередньої заявки США № 61/443092, поданої 15 лютого 2011 р., повний зміст яких, включаючи всі креслення, формули, описи та формули винаходу, включені сюди за допомогою посилання.

## ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

[02] Даний винахід описує використання реагентів, здатних взаємодіяти з імінами, для одержання кон'югатів агентів, які зв'язуються із клітинами, із ДНК-зв'язуючими цитотоксичними лікарськими речовинами, які містять одну або більше імінових функціональних груп.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

[03] У якості терапевтичних засобів проти раку все частіше тестуються моноклональні антитіла. Декілька моноклональних антитіл проти антигенів поверхні ракових кліток уже схвалено для лікування раку, наприклад, ритуксимаб - для неходжкінської лімфоми, трастузумаб - для раку молочної залози, цетуксимаб - для раку голови та шиї і раку товстої кишки, цетуксимаб, панітумумаб і бевацизумаб - для раку товстої кишки, і алемтузумаб - для хронічного лімфолейкозу (Strome, S. E., Sausville, E. A., and Mann, D., 2007, The Oncologist, 12, 1084-1095). Проте, цитотоксична активність "оголеного" антитіла може бути обмежена механізмами інгібування рецепторної функції, комплемент-залежною цитотоксичністю (CDC) та антитіло-залежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC).

[04] Підхід до посилення цитотоксичної активності антитіл до ракових клітин-мішеней полягає у зв'язуванні антитіла із цитотоксичними ефекторами (A. D. Ricart, and A. W. Tolcher, 2007, Nat. Clin. Pract. Oncol. 4, 245-255; Lambert, J., 2010, Drugs of the Future 35, 471-480). Кон'югат антитіло/цитотоксична лікарська речовина (АЦК) специфічно зв'язується з раковими клітинами, потім відбувається інтерналізація і руйнування кон'югату, що приводить до внутрішньоклітинного вивільнення токсичної лікарської речовини і, зрештою, до загибелі ракових клітин. Цитотоксичні лікарські речовини, використовувані у з'єднанні з антитілами, включають антитубулінові лікарські речовини, наприклад, майтанзиноїди та ауристатини, ДНК-зв'язуючі лікарські речовини, наприклад, каліхеаміцин, який викликає сайт-специфічне розщеплювання дволанцюгової ДНК. Ще один клас ДНК-зв'язуючих цитотоксичних лікарських речовин включає імін-вмісні піролбензодіазепіни (PBD), наприклад, N-2-імідазолілалкіл-заміщений 1,2,5-бензотіадіазепін-1,1-діоксид, патент США №6156746), бензо-піrido- або -дипіридо-тіадіазепін (WO 2004/069843), пірол[1,2-b][1,2,5]бензотіадіазепіни та похідні пірол[1,2-b][1,2,5]бензодіазепіну (WO2007/015280), похідні томайміцину (наприклад, пірол[1,4]бензодіазепіни), наприклад, описані в WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, EP 2019104 і патенті США №6156746). Інші ДНК-з'єднуючі бензодіазепінові лікарські речовини описані в патентній публікації США № 2010/0203007A1. Зазначені бензодіазепінові лікарські речовини, які містять імінові зв'язки, зв'язуються з малою борозенкою ДНК і вносять перешкоди у функціонування ДНК, що призводить до загибелі клітин.

[05] Існує потреба в нових способах одержання кон'югатів агента, який зв'язує клітини, і цитотоксичних лікарських речовин, які несуть імінову групу.

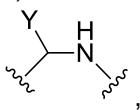
## СУТНІСТЬ ВІНАХОДУ

[06] Даний винахід описує використання реагентів, здатних взаємодіяти з імінами, для обробки імін-вмісної лікарської речовини, яка приводить до несподіваного поліпшення реакції її кон'югування з агентами, які зв'язуються із клітинами (CBA), наприклад, антитілами. Зазначені реагенти є такими, що не послаблюються властивість лікарських речовин знищувати клітини і повністю зберігається цілісність CBA (антитіла).

[07] В одному варіанті втілення даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югирований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію цитотоксичної сполуки з модифікованим CBA за pH приблизно від 4 до 9, причому:

а) модифікований CBA включає залишок біфункціонального зшиваючого агента, пов'язаного з CBA, а зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну взаємодіяти з тіолом; і

б) цитотоксична сполука включає тіолову групу і групу, представлену формулою:



де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3$ ,  $\text{HSO}_2$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ),

SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> або HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном), метабісульфіт (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетратіофосфат (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> або сіль PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> або PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>, утворену катіоном), складний ефір тіофосфату (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>, тіосульфат (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), дитіоніт (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), фосфородитіоат (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту (R<sup>k</sup>C(=O)NOH або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> або сіль HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном, наприклад, HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) або їх суміш, де R<sup>i</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup>, необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут; R<sup>j</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил.

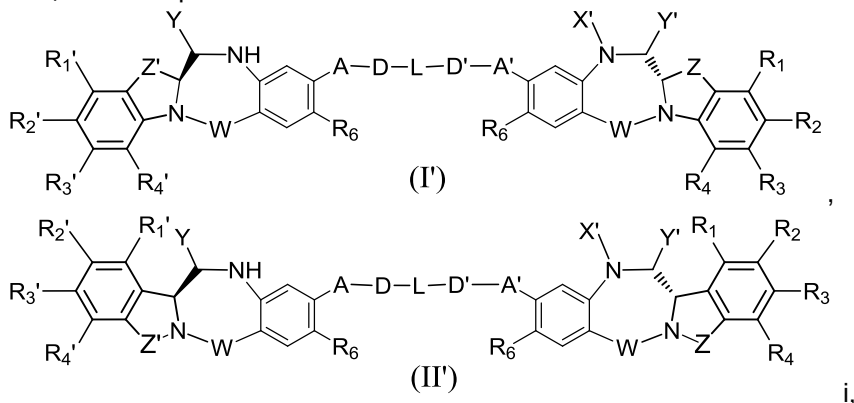
[08] У деяких варіантах втілення цитотоксичну сполуку одержують взаємодією імін-вмісної цитотоксичної сполуки, яка несе тіолову групу, з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами.

[09] У ще одному варіанті втілення даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, способу, який включає взаємодію CBA з імін-вмісною цитотоксичною сполукою, реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, і біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, з утворенням кон'югату.

[10] У ще одному варіанті втілення даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, способу, який включає:

а) взаємодію цитотоксичної сполуки із біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, групу, яка реагує з CBA (наприклад, тіолову групу, малеїмідну групу, галоацетамідну групу або аміногрупу), і групу, яка реагує із цитотоксичною сполукою, з утворенням модифікованої цитотоксичної сполуки, ковалентно зв'язаного із залишком біфункціонального зшиваючого агента, причому зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, яка реагує з CBA;

причому цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> або сіль HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> або HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном), метабісульфіт (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетратіофосфат (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> або сіль PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> або PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>, утворену катіоном), складний ефір тіофосфату (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>, тіосульфат (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), дитіоніт (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), фосфородитіоат (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту (R<sup>k</sup>C(=O)NOH або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> або сіль HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном, наприклад, HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) або їх суміш, де R<sup>i</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup>, необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут; R<sup>j</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;

X 'вибраний із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y 'вибраний із -H, оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, який має від 1 до 6 гетероатомів;

$R^c$  являє собою -H або заміщений або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

кожна із  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, який має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub> або галоген;

Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

A і A' є однаковими або різними і незалежно вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або, необов'язково, заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

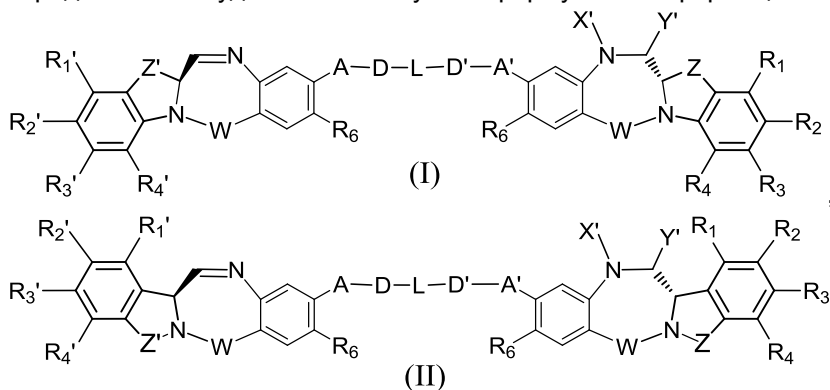
D і D' є однаковими або різними і незалежно відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

L відсутня або, якщо присутня, включає тілову групу, або являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-

членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є необов'язково заміщеним; і

б) взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з СВА за допомогою групи, яка реагує з СВА, за рН від приблизно 4 до приблизно 9, з утворенням кон'югату.

[11] У кожному з вищеописаних варіантів втілення імін-вмісна цитотоксична сполука може бути представлена будь-якою з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

5 R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

10 R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо  $-(C(=O)-)$ , -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

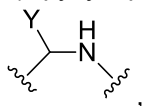
15 D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

20 L відсутня або, якщо присутня, включає тіолову групу і являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є необов'язково заміщеним.

25 [12] У ще одному варіанті втілення даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (СВА), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з СВА за рН приблизно від 4 до 9, причому модифікована цитотоксична сполука включає:

30 а) залишок біфункціонального зшиваючого агента, який зв'язаний із цитотоксичною сполукою і включає зв'язуючу групу і реакційноздатну групу, вибрану із реакційноздатного складного ефіру, і групи, яка реагує з тіолами, і

б) групу, представлену:

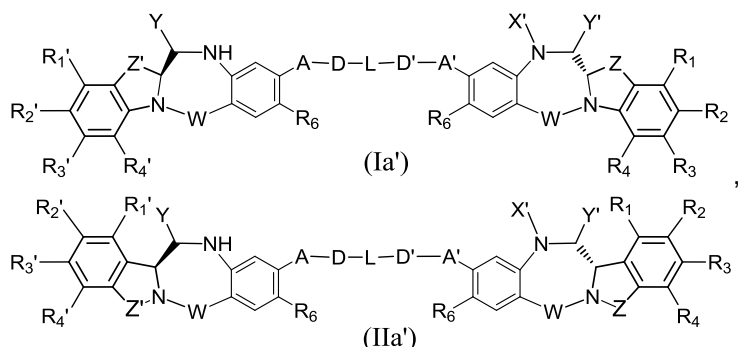


35 де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфїт ( $HSO_3$ ,  $HSO_2$  або сіль  $HSO_3^-$ ,  $SO_3^{2-}$  або  $HSO_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфїт ( $H_2S_2O_5$  або сіль  $S_2O_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагіофосфат ( $PO_3SH_3$ ,  $PO_2S_2H_2$ ,  $POS_3H_2$ ,  $PS_4H_2$  або сіль  $PO_3S^{3-}$ ,  $PO_2S_2^{3-}$ ,  $POS_3^{3-}$  або  $PS_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(R^iO)_2PS(OR^i)$ ,  $R^iS-$ ,  $R^iSO$ ,  $R^iSO_2$ ,  $R^iSO_3$ , тіосульфат ( $HS_2O_3$  або сіль  $S_2O_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $HS_2O_4$  або сіль  $S_2O_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $P(=S)(OR^k)(S)(OH)$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $R^kC(=O)NOH$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $HOCH_2SO_2^-$  або сіль  $HOCH_2SO_2^+$ , утворену катіоном, наприклад,  $HOCH_2SO_2^-Na^+$ ) або їх суміш, де  $R^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-N(R^j)_2$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SO_3H$  і  $-PO_3H$ ;  $R^i$ , необов'язково, може бути додатково заміщена замісником для алкілу, описаним тут;  $R^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $R^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероциклік або гетероарил.

50 [13] У деяких варіантах втілення модифіковану цитотоксичну сполуку одержують шляхом взаємодії реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, з імін-вмісною цитотоксичною сполукою, яка несе зв'язуючу групу і реакційноздатну групу.

[14] У кожному з вищеописаних варіантів втілення модифікована цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

Y являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_2^-$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катионом),  
 5 метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катионом), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_2$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катионом), складний ефір тіофосфату ( $(\text{R}^1\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^1)$ ,  $\text{R}^1\text{S}-$ ,  $\text{R}^1\text{SO}$ ,  $\text{R}^1\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^1\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катионом), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катионом), фосфородітіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катионом), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катионом), формальдегідсульфоксидат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ , утворену катионом, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^1$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^1)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^1$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^1$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;

X вибрана із -H, амін-блокуючої групи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y вибрана із -H, оксогрупи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

$\text{R}^c$  являє собою -H або заміщений або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;

кожна із  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_1'$ ,  $\text{R}_2'$ ,  $\text{R}_3'$  і  $\text{R}_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ , галогену, гуанідинію  $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NCO}$ ,  $-\text{NR}'\text{COR}''$ ,  $-\text{SR}$ , сульфоксиду, представленого  $-\text{SOR}'$ , сульфону, представленого  $-\text{SO}_2\text{R}'$ , сульфонату  $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ , сульфату  $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ , сульфонаміду, представленого  $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ціаногрупи, азидної групи,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$  і зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою;

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із  $\text{R}'$  і  $\text{R}''$ , незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково



заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^C$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

5  $n$  являє собою ціле число від 1 до 24;

$W$  вибрана із  $C=O$ ,  $C=S$ ,  $CH_2$ ,  $BH$ ,  $SO$  і  $SO_2$ ;

$R_6$  являє собою  $-H$ ,  $-R$ ,  $-OR$ ,  $-SR$ ,  $-NR'R''$ ,  $-NO_2$ , галоген або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;

$Z$  і  $Z'$ , незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-$   
10  $(CH_2)_{na'}$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ ;

$n'$  і  $na'$  є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

$R_7$  і  $R_8$  є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-NHR'$ , мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

15  $R_9$ , незалежно, вибрана із  $-H$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

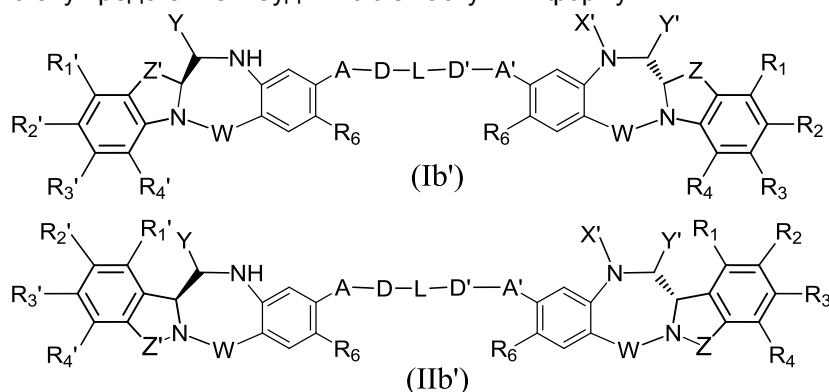
$A$  і  $A'$  є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із  $-O-$ , оксо  $-(C(=O)-)$ ,  $-CRR'O-$ ,  $-CRR'-$ ,  
20  $-S-$ ,  $-CRR'S-$ ,  $-NR_5$  і  $-CRR'N(R_5)-$ ;

$R_5$ , в кожному випадку незалежно, являє собою  $-H$  або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

$D$  і  $D'$  є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

$L$  відсутня, являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл або алкеніл, необов'язково, заміщені зв'язуючою групою з приєднаною до неї реакційноздатною групою; феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце можуть бути, необов'язково, заміщені, причому замітник може являти собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою.

35 [15] У кожному з вищеписаних варіантів втілення цитотоксична сполука і зв'язуюча група кон'югату представлені будь-якою з наступних формул:



або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

40  $Y$  являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $HSO_3^-$ ,  $HSO_2^-$  або сіль  $HSO_3^-$ ,  $SO_3^{2-}$  або  $HSO_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $H_2S_2O_5$  або сіль  $S_2O_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат ( $PO_3SH_3$ ,  $PO_2S_2H_2$ ,  $POS_3H_2$ ,  $PS_4H_2$  або сіль  $PO_3S^{3-}$ ,  $PO_2S_2^{3-}$ ,  $POS_3^{3-}$  або  $PS_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(R^iO)_2PS(OR^i)$ ,  $R^iS-$ ,  $R^iSO$ ,  $R^iSO_2$ ,  $R^iSO_3$ , тіосульфат ( $HS_2O_3$  або сіль  $S_2O_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $HS_2O_4$  або сіль  $S_2O_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $P(=S)(OR^k)(S)(OH)$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $R^kC(=O)NOH$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $HOCH_2SO_2^-$  або сіль  $HOCH_2SO_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,

HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) або їх суміш, де R<sup>i</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замінником, вибраним із -N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup>, необов'язково, може бути додатково заміщений замінником для алкілу, описаним тут; R<sup>j</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;

X 'вибрана із -H, амін-блокуючої групи, зв'язуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y 'вибрана із -H, оксогрупи, зв'язуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

R<sup>c</sup> являє собою -H або заміщений або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або зв'язуючу групу;

кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, галогену, гуанідинію [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонаміду, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' і зв'язуючої групи;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup>;

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup> і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, галоген або зв'язуючу групу;

Z і Z', незалежно, вибрані із -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>- і -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

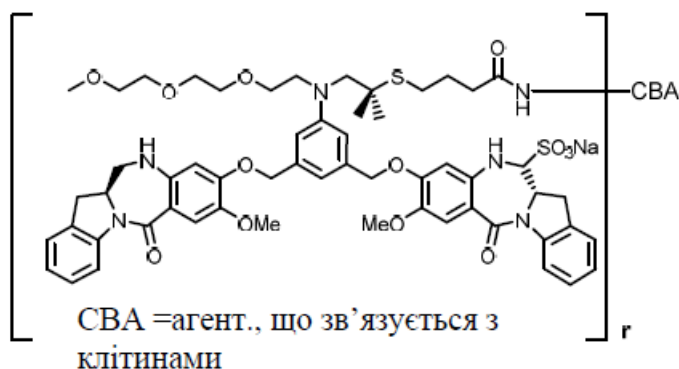
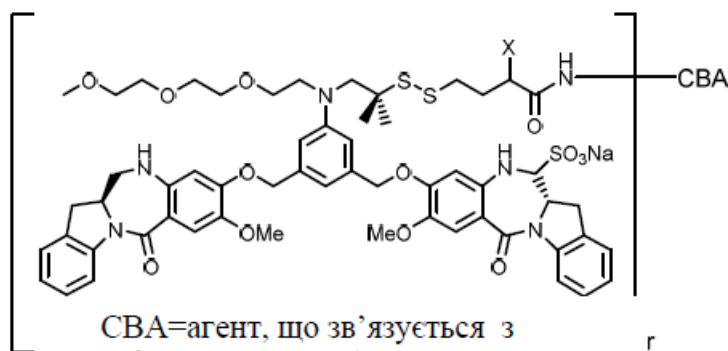
R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний

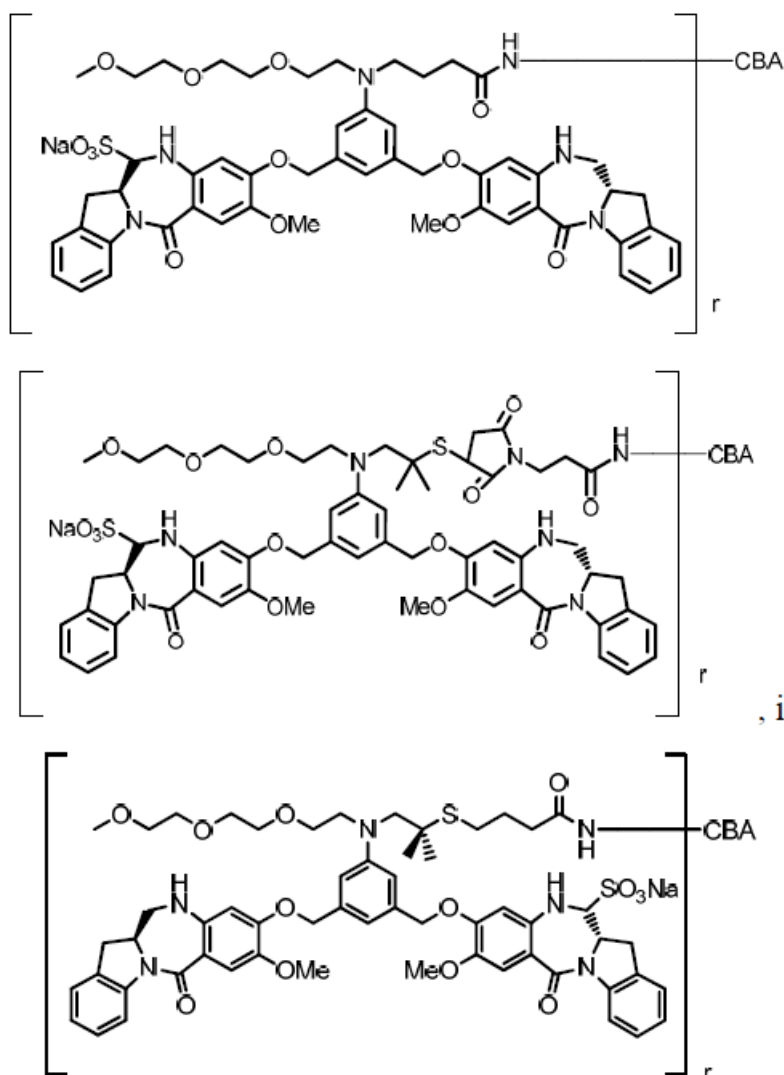
або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $(-OCH_2CH_2)_n$ ;

L відсутня, являє собою зв'язуючу групу, мономер поліетиленгліколю  $(-OCH_2CH_2)_n$ , необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл або алкеніл, необов'язково, заміщені зв'язуючою групою, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце можуть бути, необов'язково, заміщені, причому замітник може включати зв'язуючу групу.

[16] Деякі кращі кон'югати, які можна одержати відповідно до кожного зі способів згідно з винаходом, включають:





де CBA є агентом, який зв'язується із клітинами, наприклад, антитілом, а  $r$  є цілим числом між 1-20, переважно - між 1-10 або 1-5.

- [17] Як використовується тут, стосовно групи (наприклад,  $R^c$ , L, X і т.д.), "являє собою/бути" (або "не являє собою") зв'язуючу групу або зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою означає, що група "включає" (або "не включає") зв'язуючу групу або зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

- [18] На Фіг. 1 показані мас-спектри деглікозилізованих кон'югатів huMy9-6-2, виготовлених без та з використанням бісульфіту, які включають 1,4 DAR (А) і 3,1 DAR (Б), відповідно. DAR: співвідношення лікарська речовина - антитіло.

[19] На Фіг. 2 показана аналогічна цитотоксичність *in vitro* кон'югатів huMy9-6/лікарська речовина 2, отриманих без і з використанням бісульфіту натрію, проти клітин HL60, які експресують антиген CD33.

- [20] На Фіг. 3 показана аналогічна цитотоксичність *in vitro* кон'югатів антитіло проти CD22/лікарська речовина 2, отриманих без і з використанням бісульфіту натрію, проти клітин BJAB, які експресують антиген CD22.

[21] На Фіг. 4 показаний обернено-фазовий ВЕРХ-аналіз лікарської речовини 2 і лікарської речовини 2, обробленої бісульфітом натрію.

- [22] На Фіг. 5 показаний МС-аналіз деглікозилізованої huMy9-6-SPDB - лікарської речовини 1, отриманої з і без використання бісульфіту натрію, з використанням 7 молярних еквівалентів 1 на антитіло. А) Кон'югат одержували без використання бісульфіту натрію із середнім

співвідношенням лікарська речовина 1/антитіло, яке дорівнює 1,4, і з різновидами антитіла з до трьох приєднаних молекул лікарської речовини 1 на антитіло. Б) Кон'югат одержували з використанням бісульфіту натрію із середнім співвідношенням лікарська речовина 1/антитіло, яке дорівнює 2,5, і різновидами антитіла із вмістом до семи приєднаних молекул лікарської речовини 1 на антитіло.

[23] На Фіг. 6 показано, що додавання бісульфіту натрію до реакційної суміші під час кон'югування лікарської речовини 1 не призводить до фрагментації антитіла невидновним ДСН-ПААГ; аналіз гелю на чіпі.

[24] На Фіг. 7-11 показані типові способи згідно з даним винаходом для одержання кон'югату агент, який зв'язується із клітинами /лікарська речовина.

[25] На Фіг. 12 показаний мас-спектрометричний (МС) аналіз деглікозильованого MY9-6-SPDB-1, отриманого шляхом кон'югування сполуки 1, яка містить NHS-ефір (одноетапний реагентний спосіб), безпосередньо із залишками лізину антитіла, або кон'югування сполуки 1d з антитілом, модифікованим дитіопіридином (двоетапний спосіб).

[26] На Фіг. 13 показані дані МС для MY9-6-сульфо-SPDB-1, отриманого при використанні двоетапного способу за різних рН. Підвищений час реакції, очевидно, корелює з підвищеною CD33-антиген-незалежною цитотоксичністю *in vitro*, виміряною на клітинах HL60-QC, попередньо оброблених 1 мкМ некон'югованого huMy9-6. Антиген-залежна цитотоксичність для всіх кон'югатів була так само висока ( $IC_{50} \sim 4$  пМ). Короткий час реакції (1-3 ч) є кращим для мінімізації фрагментації антитіла і неспецифічного знищення клітин для My9-6-сульфо-SPDB-1 *in vitro*.

[27] На Фіг. 14 показані дані МС для chKTI-сульфо-SPDB-1, отриманого при використанні двоетапного способу з різними співвідношеннями сполука 1d/лінкер.

[28] На Фіг. 15 показане використання ковалентних імінових реагентів для поліпшення характеристик кон'югату антитіло/лікарська речовина (% мономера і лікарського навантаження).

[29] На Фіг. 16 показана схема двоетапного синтезу типових кон'югатів антитіло/лікарська речовина.

[30] На Фіг. 17 показана цитотоксичність і специфічність *in vitro* кон'югатів huMy9-6-SPDB-1f проти різних клітинних ліній. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[31] На Фіг. 18 показано, що кон'югування димера не знижує спорідненості зв'язування антитіла. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[32] На Фіг. 19 показана антипухлинна активність *in vivo* кон'югату huMy9-6. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[33] На Фіг. 20 показана цитотоксичність *in vitro* кон'югату huMy9-6-SPDB-1F проти антиген-позитивних клітин. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[34] На Фіг. 21 показана цитотоксичність *in vitro* для huMy9-6-SPDB-1f (A), huMy9-6-сульфоSPDB-1f (Б) і huMy9-6-BMPS-1f (B) проти клітин HL60/QC ( $Ag^+$ ) з і без блокування антиген-зв'язуючих сайтів. Слід зазначити, що у всіх трьох експериментах (34A, 34Б і 34B) до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[35] На Фіг. 22 показана цитотоксичність *in vitro* для chB38.1-SPDB-1f (A) і chB38.1-сульфоSPDB-1f (Б) проти клітин COLO205 ( $Ag^+$ ). Слід зазначити, що в обох експериментах до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[36] На Фіг. 23 показана ефективність *in vivo* huMy9-6-SPDB-1f у мишей, які несуть HL60/QC. Слід зазначити, що до реакційного середовища для кон'югування додавали бісульфіт натрію.

[37] На Фіг. 24 показана антипроліферативна активність шляхом порівняння (A) huMy9-6-SPDB-1f, (Б) huMy9-6-сульфоSPDB-1f і (B) huMy9-6-BMPS-1f проти клітин OCI-AML3 ( $Ag^+$ ) з і без блокування антиген-зв'язуючих сайтів. Слід зазначити, що у всіх трьох експериментах до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[38] На Фіг. 25 показана ефективність *in vivo* huMy9-6-BMPS-1f у мишей, які несуть пухлину MOLM-13. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[39] На Фіг. 26 показана типова схема синтезу кон'югату сульфований фолат/цитотоксична сполука. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[40] На Фіг. 27 показана ефективність *in vivo* huMy9-6-лікарська речовина 2 у мишей, які несуть пухлину MOLM-13. Слід зазначити, що до реакційного середовища для виготовлення кон'югату додавали бісульфіт натрію.

[41] На Фіг. 28 показане одержання huMy9-6-сульфо-SPDB-1d з використанням лінкера 4-нітроРу-сульфо-SPDB, який володіє високою реакційною здатністю.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[42] У даному розділі наведений докладний опис із посиланнями на конкретні варіанти втілення винаходу, приклади яких знайшли відображення в доданих структурах і формулах. Хоча даний винахід описаний стосовно конкретних наведених варіантів втілення, слід розуміти, що даний винахід не обмежений зазначеними варіантами втілення. Навпаки, мається на увазі, що винахід охоплює всі альтернативи, модифікації та еквіваленти, які можуть бути включені в об'єм даного винаходу, як визначено формулою винаходу. Для фахівця в даній галузі техніки очевидні численні способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним тут, які можна використовувати для здійснення даного винаходу.

[43] Слід розуміти, що будь-який з описаних тут варіантів втілення, включаючи варіанти, описані в різних аспектах даного винаходу (наприклад, сполуки, молекули сполука-лінкер, кон'югати, композиції, способи їх одержання та застосування), і різні частини опису (включаючи варіанти втілення, описані тільки в Прикладах) можна поєднувати з одним або більше інших варіантів втілення винаходу, якщо вони не заперечуються або не є невідповідними явно. Комбінація варіантів втілення винаходу не обмежується зазначеними специфічними комбінаціями, заявленими в декількох залежних пунктах формули винаходу.

#### Визначення

[44] "Лінійний або розгалужений алкіл", як використовується тут, стосується насиченого лінійного або розгалуженого одновалентного вуглеводного радикалу із від одного до двадцяти атомів вуглецю. Приклади алкілів включають метил, етил, 1-пропіл, 2-пропіл, 1-бутил, 2-метил-1-пропіл,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 2-бутил, 2-метил-2-пропіл, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил, 3,3-диметил-2-бутил, 1-гептил, 1-октил і т.п., але не обмежуються ними. Переважно алкіл має від одного до десяти атомів вуглецю. Більш переважно алкіл має від одного до чотирьох атомів вуглецю.

[45] "Лінійний або розгалужений алкеніл" стосується лінійного або розгалуженого одновалентного вуглеводного радикалу із від двох до двадцяти атомів вуглецю із щонайменше одним ненасиченим сайтом, тобто подвійним зв'язком вуглець-вуглець, причому алкеніл-радикал включає радикали з "цис-" і "транс-" орієнтацією або, як альтернатива, в орієнтаціях "E" і "Z". Приклади включають етиленіл або вініл ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), аліл ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) і т.п., але не обмежуються ними. Переважно алкеніл має від двох до десяти атомів вуглецю. Більш переважно алкеніл містить від двох до чотирьох атомів вуглецю.

[46] "Лінійний або розгалужений алкініл" стосується лінійного або розгалуженого одновалентного вуглеводного радикалу із від двох до двадцяти атомів вуглецю із щонайменше одним ненасиченим сайтом, тобто потрійним зв'язком вуглець-вуглець. Приклади включають етиніл, пропініл, 1-бутиніл, 2-бутиніл, 1-пентиніл, 2-пентиніл, 3-пентиніл, гексиніл і т.п., але не обмежуються ними. Переважно алкініл має від двох до десяти атомів вуглецю. Більш переважно алкініл має від двох до чотирьох атомів вуглецю.

[47] Терміни "карбоцикл", "карбоцикліл" і "карбоциклічне кільце" стосуються одновалентного неароматичного, насиченого або частково ненасиченого кільця, яке має від 3 до 12 атомів вуглецю - у випадку моноциклічного кільця, або від 7 до 12 атомів вуглецю - у випадку бициклічного кільця. Біциклічні карбоцикли, які мають від 7 до 12 атомів, можуть бути організовані, наприклад, у вигляді біцикло [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6], а біциклічні карбоцикли, які мають 9 або 10 атомів у кільці, можуть бути організовані у вигляді системи біцикло [5,6] або [6,6], або у вигляді місткових систем, наприклад, біцикло[2.2.1]гептану, біцикло[2.2.2]октану та біцикло[3.2.2]нонану. Приклади моноциклічних карбоциклів включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-еніл, 1-циклопент-2-еніл, 1-циклопент-3-еніл, циклогексил, 1-циклогекс-1-еніл, 1-циклогекс-2-еніл, 1-циклогекс-3-еніл, циклогексадієніл, циклогептил, циклооктил, циклононіл, циклодецил, циклоундецил, циклододецил і т.п., але не обмежуються ними.

[48] Терміни "циклічний алкіл" і "циклоалкіл" можна використовувати на рівних підставах. Вони стосуються одновалентного насиченого карбоциклічного кільцевого радикалу. Переважно циклічний алкіл є 3-7-членним моноциклічним кільцевим радикалом. Більш переважно циклічний алкіл є циклогексилком.

[49] Термін "циклічний алкеніл" стосується карбоциклічного кільцевого радикалу, який має щонайменше один подвійний зв'язок у складі кільцевої структури.

[50] Термін "циклічний алкініл" стосується карбоциклічного кільцевого радикалу, який має

щонайменше один потрібний зв'язок у складі кільцевої структури.

[51] "Арил" означає одновалентний ароматичний вуглеводневий радикал із 6-18 атомів вуглецю, отриманий видаленням одного атома водню від одного атома вуглецю вихідної ароматичної кільцевої системи. Деякі арильні групи представлені в типових структурах як "Ar". Арил включає біциклічні радикали, які включають ароматичне кільце, конденсовані з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним або гетероциклічним кільцем. Типові арильні групи включають радикали, які походять від бензолу (феніл), заміщені бензоли, нафталін, антрацен, інденіл, інданіл, 1,2-дигідронафталін, 1,2,3,4-тетрагідронафтил і т.п., але не обмежуються ними. Переважно арил є фенільною групою.

[52] Терміни "гетероцикл", "гетероциклі" і "гетероциклічне кільце" використовуються тут на рівних підставах і стосуються насиченого або частково ненасиченого (тобто який має одну або більше подвійних і/або потрібних зв'язків у складі кільця) карбоциклічного радикалу із від 3 до 18 атомів у складі кільця, причому щонайменше один атом у складі кільця є гетероатомом, вибраним з азоту, кисню, фосфору та сірки, а інші атоми у складі кільця є атомами C, де один або більше атомів у складі кільця, необов'язково, незалежно, заміщені одним або більше замісниками, описаними нижче. Гетероцикл може бути моноциклічною структурою, яка має від 3 до 7 членів кільця (2-6 атомів вуглецю і 1-4 гетероатоми, вибраних з N, O, P і S), або бициклічною структурою, яка має від 7 до 10 членів кільця (4-9 атомів вуглецю і 1-6 гетероатомів, вибраних з N, O, P і S), наприклад: системою біцикло [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6]. Гетероцикли описані в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), зокрема, в розділах 1, 3, 4, 6, 7 і 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, с 1950 до нашого часу), зокрема, томах 13, 14, 16, 19 і 28; і J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Гетероциклі" також включає радикали, де гетероциклічні радикали конденсовані з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним або гетероциклічним кільцем. Приклади гетероциклічних кілець включають піролідиніл, тетрагідрофураніл, дигідрофураніл, тетрагідротієніл, тетрагідропіраніл, дигідропіраніл, тетрагідротіопіраніл, піперидино, морфоліно, тіоморфоліно, тіоксаніл, піперазиніл, гомопіперазиніл, азетидиніл, оксетаніл, тіетаніл, гомопіперидиніл, оксепаніл, тіепаніл, оксазепініл, діазепініл, тіазепініл, 2-піролініл, 3-піролініл, індолініл, 2H-піраніл, 4H-піраніл, диоксаніл, 1,3-диоксоланіл, піразолініл, дитіаніл, дитіоланіл, дигідропіраніл, дигідротієніл, дигідрофураніл, піразолідиніл, імідазолініл, імідазолідиніл, 3-азабіцикло[3.1.0]гексаніл, 3-азабіцикло[4.1.0]гептаніл і азабіцикло[2.2.2]гексаніл, але не обмежуються ними. У рамки даного визначення також входять спірогрупи. Прикладами гетероциклічних груп, де кільцеві атоми заміщені оксогрупами (=O), є піримідиноніл і 1,1-диоксотіоморфолініл.

[53] Термін "гетероарил" стосується одновалентного ароматичного радикалу з 5- або 6-членних кілець і включає системи конденсованих кілець (щонайменше одне з яких є ароматичним) з 5-18 атомів, які містять один або більше гетероатомів, незалежно вибраних з азоту, кисню та сірки. Прикладами гетероарильних груп є піридиніл (включаючи, наприклад, 2-гідроксипіридиніл), імідазоліл, імідазопіридиніл, піримідиніл (включаючи, наприклад, 4-гідроксипіримідиніл), піразоліл, триазоліл, піразиніл, тетразоліл, фурил, тієніл, ізоксазоліл, тіазоліл, оксазоліл, ізотіазоліл, піроліл, хінолініл, ізохінолініл, індоліл, бензімідазоліл, бензофураніл, цинолініл, індазоліл, індолізиніл, фталазиніл, піридазиніл, триазиніл, ізоіндоліл, птеридиніл, пуриніл, оксадіазоліл, триазоліл, тіадіазоліл, фуразаніл, бензофуразаніл, бензотіофеніл, бензотіазоліл, бензоксазоліл, хіназолініл, хіноксалініл, нафтиридиніл і фуропіридиніл.

[54] Гетероциклічна або гетероарильна групи можуть, за можливості, приєднуватися через атом вуглецю (вуглець-зв'язана група) або азоту (азот-зв'язана група). У якості необмежуючого прикладу, гетероцикли або гетероарили, приєднані через атом вуглецю, приєднані за положенням 2, 3, 4, 5 або 6 піридину, положенням 3, 4, 5 або 6 піридазину, положенням 2, 4, 5 або 6 піримідину, положенням 2, 3, 5 або 6 піразину, положенням 2, 3, 4 або 5 фурану, тетрагідрофурану, тіофурану, тіофену, піролу або тетрагідропіролу, положенням 2, 4 або 5 оксазолу, імідазолу або тіазолу, положенням 3, 4 або 5 ізоксазолу, піразолу або ізотіазолу, положенням 2 або 3 азиридину, положенням 2, 3 або 4 азетидину, положенням 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 хіноліну або положенням 1, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ізохіноліну.

[55] У якості необмежуючого прикладу, гетероцикли або гетероарили, приєднані через атом азоту, приєднані за положенням 1 азиридину, азетидину, піролу, піролідину, 2-піроліну, 3-піроліну, імідазолу, імідазолідину, 2-імідазоліну, 3-імідазоліну, піразолу, піразоліну, 2-піразоліну, 3-піразоліну, піперидину, піперазину, індолу, індоліну, 1H-індазолу, положенням 2 ізоіндолу або ізоіндоліну, положенням 4 морфоліну і положенням 9 карбазолу або O-карболіну.

[56] Гетероатоми, присутні у складі гетероарилу або гетероциклілу, включають окиснені форми, наприклад, NO, SO і SO<sub>2</sub>.

[57] Термін "галo" або "галоген" стосується F, Cl, Br або I.

[58] Алкіл, алкеніл, алкініл, циклічний алкіл, циклічний алкеніл, циклічний алкініл, карбоцикліл, арил, гетероцикліл і гетероарил, описані вище, можуть бути, необов'язково, заміщені одним або більше (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 або більше) замісників.

[59] Якщо замісник описаний як "заміщений", то замість атома водню біля атома вуглецю, кисню, сірки або азоту у складі замісника присутній замісник, який не є атомом водню. Так, наприклад, заміщений алкільний замісник є алкільним замісником, де щонайменше один замісник, який не є атомом водню, є присутнім замість атома водню у складі зазначеного алкільного замісника. З метою ілюстрації монофторалкіл є алкілом, заміщеним фтор-замісником, а дифторалкіл є алкілом, заміщеним двома фторами-замісниками. Слід розуміти, що якщо у складі замісника присутня більше однієї заміни, кожен замісник, який не є атомом водню, може бути однаковим або відмінним (якщо не зазначене інше).

[60] Якщо замісник описаний як "необов'язково заміщений", зазначений замісник може бути або (1) незаміщений, або (2) заміщений. Якщо атом вуглецю замісника описаний як необов'язково заміщений одним або декількома замісниками зі списку, один або кілька атомів водню біля атома вуглецю (якщо такі є) окремо і/або спільно можуть бути заміщені незалежно вибраним необов'язковим замісником. Якщо атом азоту замісника описаний як необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з переліку, кожен з одного або декількох атомів водню біля атома азоту (якщо такі є) може бути заміщений незалежно вибраним необов'язковим замісником. Один типовий замісник може бути зображений як -NR'R", де R' і R", разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, можуть утворювати гетероциклічне кільце. Гетероциклічне кільце, утворене R' і R" разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, може бути частково або повністю насиченим. В одному варіанті втілення зазначене гетероциклічне кільце містить від 3 до 7 атомів. В іншому варіанті втілення гетероциклічне кільце вибране із групи, яка складається з піролілу, імідазолілу, піразолілу, триазолілу, тетразолілу, ізоксазолілу, піридилу та тіазолілу.

[61] У даному описі терміни "замісник", "радикал" і "група" використовуються взаємозамінно.

[62] Якщо група замісників спільно описана як необов'язково заміщена одним або більше замісників з переліку, вказана група може включати: (1) замісники, які не заміщуються, (2) замісники, які заміщуються, незаміщені необов'язковими замісниками, і/або (3) замісники, які заміщуються, заміщені одним або більше необов'язкових замісників.

[63] Якщо замісник описаний як необов'язково заміщений певною кількістю замісників, які не є воднем, то замісники можуть бути або (1) незаміщеними; або (2) заміщеними зазначеною певною кількістю замісників, які не є атомами водню, або за максимальною кількістю положень, які заміщуються, у складі замісника, залежно від того, яке значення із зазначених є меншим. Так, наприклад, якщо замісник описаний як гетероарил, необов'язково заміщений до 3 замісниками, які не є атомами водню, то будь-який гетероарил з менш ніж 3 положеннями, які заміщуються, може, необов'язково, бути заміщеним лише до такої кількості замісників, які не є атомами водню, скільки положень, які заміщуються, містить зазначений гетероарил. Такі замісники в необмежуваних прикладах можуть бути вибрані з лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арилу, гетероарилу, гетероциклілу, галогену, гуанідинію [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR<sup>100</sup>, NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>101</sup>COR<sup>102</sup>, -SR<sup>100</sup>, сульфоксиду, представленого -SOR<sup>101</sup>, сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R<sup>101</sup>, сульфонату -SO<sub>3</sub>M, сульфату -OSO<sub>3</sub>M, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>, ціаногрупи, азидної групи, -COR<sup>101</sup>, -OCOR<sup>101</sup>, -OCONR<sup>101</sup>R<sup>102</sup> і мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>101</sup>, де M являє собою H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>); кожна із R<sup>101</sup>, R<sup>102</sup> і R<sup>103</sup>, незалежно, вибрані із H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>104</sup>, де n являє собою ціле число від 1 до 24, арилу, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, гетероциклічного кільця, яке має від 3 до 10 атомів вуглецю, і гетероарилу, який має від 5 до 10 атомів вуглецю; а R<sup>104</sup> являє собою H або лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, де алкіл, алкеніл, алкініл, арил, гетероарил і гетероцикліл в групах, представлених R<sup>100</sup>, R<sup>101</sup>, R<sup>102</sup>, R<sup>103</sup> і R<sup>104</sup>, необов'язково заміщені одним або більше (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 або більше) замісників, незалежно вибраних із галогену, -OH, -CN, -NO<sub>2</sub> і незаміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю. Переважно замісники необов'язково заміщеного алкілу, алкенілу, алкінілу, циклічного алкілу, циклічного алкенілу, циклічного алкінілу, карбоциклілу, арилу, гетероциклілу і гетероарилу, описаних вище, включають галоген, -CN, -NR<sup>102</sup>R<sup>103</sup>, -CF<sub>3</sub>, -OR<sup>101</sup>, арил, гетероарил, гетероцикліл, -SR<sup>101</sup>, -SOR<sup>101</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>101</sup> і -SO<sub>3</sub>M.



[64] Терміни "сполука" або "цитотоксична сполука", "цитотоксичний димер" і "цитотоксична димерна сполука" використовуються на рівних підставах. Мається на увазі, що вони включають сполуки, для яких у даному винаході описана структура або формула, або будь-яке біологічно активне похідне, або їх структура або формула, або будь-яке похідне включені за допомогою посилання. Зазначений термін також включає стереоізомери, геометричні ізомери, таутомери, сольвати, метаболіти, солі (наприклад, фармацевтично прийнятні солі) і проліки, і солі проліків сполук усіх формул, описаних у даному винаході. Зазначений термін також включає будь-які сольвати, гідрати і поліморфи кожного з вищевказаного. Конкретне перерахування "стереоізомерів", "геометричних ізомерів", "таутомерів", "сольватів", "метаболітів", "солі", "проліки", "солі проліків", "кон'югатів", "солей кон'югатів", "сольвату", "гідрату" або "поліморфу" у деяких аспектах винаходу, описаного в даний заявці, не повинно тлумачитися як передбачувана відсутність зазначених форм в інших аспектах винаходу, де термін "сполука" використовують без перерахування зазначених інших форм. В одному варіанті втілення цитотоксична сполука включає зв'язуючу групу або зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою. У якості альтернативи цитотоксична сполука не містить зв'язуючої групи або зв'язуючої групи із приєднаною до неї реакційноздатною групою.

[65] Термін "кон'югат", як використовується тут, стосується сполуки, описаної тут, або її похідного, приєднаного до агента, який зв'язується із клітинами.

[66] Термін "зв'язуваний з агентом, який зв'язується із клітиною", як використовується тут, стосується сполук, описаних тут, або їх похідних, які включають щонайменше одну зв'язуючу групу або її попередник, придатні для зв'язування цих сполук або їх похідних з агентом, який зв'язується із клітинами.

[67] Термін "попередник" даної групи стосується будь-якої групи, яка може привести до одержання зазначеної групи за рахунок деблокування, хімічної модифікації або реакції приєднання.

[68] Термін "приєднаний до агента, який зв'язується із клітинами" стосується молекули кон'югату, яка включає щонайменше одну зі сполук, описаних тут (наприклад, сполук і сполук лікарська речовина-лінкер, описаних тут), або її похідне, зв'язане з агентом, який зв'язується із клітинами, за допомогою відповідної зв'язуючої групи або її попередника.

[69] Термін "хіральний" стосується молекул, які володіють властивістю не співпадати при накладенні зі своїм дзеркальним відображенням, у той час як термін "ахіральний" стосується молекул, які при накладенні співпадають зі своїм дзеркальним відображенням.

[70] Термін "стереоізомер" стосується сполук, які характеризуються однаковим хімічним складом і внутрішньомолекулярними зв'язками, але різними типами орієнтації атомів у просторі, які не можуть взаємоперетворюватися шляхом повороту навколо одинарних зв'язків.

[71] "Диастереомери" стосується стереоізомерів із двома або більше центрів хіральності, молекули яких не є дзеркальними відображеннями один одного. Диастереоізомери мають різні фізичні властивості, наприклад, температури плавлення, температури кипіння, спектральні властивості і реакційну здатність. Суміші диастереоізомерів можна розділити за допомогою аналітичних методик з високим ступенем поділу, таких як кристалізація, електрофорез і хроматографія.

[72] "Енантіомери" стосується двох стереоізомерів сполуки, які є дзеркальними відображеннями один одного, які не співпадають при накладенні.

[73] Стереохімічні визначення і умовні позначки, використовувані тут, у цілому відповідають S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; і Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Сполуки згідно з винаходом можуть містити асиметричні або хіральні центри і, отже, існують у різних стереоізомерних формах. Передбачається, що всі стереоізомерні форми сполук згідно з винаходом, включаючи диастереомери, енантіомери і атропізомери, а також їх суміші, наприклад, рацемічні суміші, не обмежуючись ними, утворюють частину даного винаходу. Багато органічних сполук існують у вигляді оптично активних форм, тобто мають здатність обертати площину плоскополяризованого світла. Під час опису оптично активних сполук для позначення абсолютної конфігурації молекули відносно її хіального(их) центру(ів) використовують префікси D і L або R і S. Префікси d і l або (+) і (-) використовують для позначення знаку повороту плоскополяризованого світла сполукою, при цьому префікси (-) або l означають, що сполука є лівообертальною. Сполука із префіксом (+) або d є правообертальною. Для даної хімічної структури ці стереоізомери є однаковими, за винятком того, що вони являють собою дзеркальні відображення один одного. Конкретний стереоізомер також можна розглядати в якості енантіомера, при цьому суміш таких ізомерів часто називають енантіомерною сумішшю. Суміш енантіомерів 50:50 називають рацемічною сумішшю або

рацематом; зазначена суміш може утворюватися у випадку, якщо в хімічній реакції або процесі відсутні стереовибірковість або стереоспецифічність. Терміни "рацемічна суміш" і "рацемат" стосуються еквімолярної суміші двох типів енантіомерів, яка не володіє оптичною активністю.

[74] Термін "таутомер" або "таутомерна форма" стосується структурних ізомерів з різною енергією, взаємоперетворюваними при переході низькоенергетичного бар'єра. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) включають взаємоперетворення за допомогою міграції протона, наприклад, при кето-енольній та імін-енамінній ізомеризації. Валентні таутомери включають взаємоперетворення шляхом реорганізації деяких електронних зв'язків.

[75] Термін "проліки", як використовується в даній заявці, стосується попередника або похідної сполуки згідно з винаходом, який здатен ферментативно або гідролітично активуватися або перетворюватися в більш активну вихідну форму. Див., наприклад, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) і Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Проліки згідно з даним винаходом включають складноефірні проліки, фосфат-вмісні проліки, тіофосфат-вмісні проліки, сульфат-вмісні проліки, пептид-вмісні проліки, проліки, модифіковані D-амінокислотами, глікозильовані проліки,  $\beta$ -лактам-вмісні проліки, проліки, які містять необов'язково заміщений феноксиацетамід, проліки, які містять необов'язково заміщений фенолацетамід, 5-фторцитозинові та інші 5-фторуридинові проліки, які можна перетворити на більш активні цитотоксичні вільні лікарські речовини, але не обмежуються ними. Приклади цитотоксичних лікарських речовин, які можна перетворити у форму проліків для використання в даному винаході, включають сполуки згідно з винаходом та хіміотерапевтичні агенти, наприклад, описані вище, але не обмежуються ними.

[76] Крім того, мають на увазі, що термін "проліки" включає похідну сполуки, здатну піддаватися гідролізу, окисненню або іншим способом вступати в реакцію в біологічних умовах (in vitro або in vivo) з одержанням сполуки згідно з даним винаходом. Проліки можуть бути активними тільки після такої реакції в біологічних умовах або можуть мати активність у непрореагованій формі. Приклади проліків, розглянуті в даному винаході, включають аналоги або похідні сполук будь-якої з формул, описаних тут, які включають молекули, які біогідролізуються, наприклад, біогідролізовні амідні, біогідролізовні складноефірні, біогідролізовні карбаматні, біогідролізовні карбонатні, біогідролізовні уреїдні, а також біогідролізовні фосфатні аналоги, але не обмежуються ними. Інші приклади проліків включають похідні сполук будь-якої з формул, описаних тут, які включають -NO, -NO<sub>2</sub>, -ONO або -ONO<sub>2</sub>-групи. Проліки звичайно можна одержати, використовуючи широко відомі способи, наприклад, способи, описані в Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); див. також Goodman and Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs".

[77] Одна краща форма проліків згідно з винаходом включає сполуки (з або без лінкерних груп) і кон'югати згідно з винаходом, які містять адукт, утворений між імінним зв'язком сполук/кон'югатів і реагентом, здатним взаємодіяти з імінами.

[78] Термін "реагент, здатний взаємодіяти з імінами" стосується реагенту, здатного взаємодіяти з іміногрупою. Приклади реагентів, здатних взаємодіяти з імінами, включають сульфіти (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> або сіль HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> або HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном), метабісульфіт (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагіофосфати (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>3</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>3</sub> або сіль PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> або PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>, утворену катіоном), складні ефіри тіофосфату ((R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>SH, R<sup>i</sup>SON, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>H, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>H), різні аміни (гідроксиламін (наприклад, NH<sub>2</sub>OH), гідазин (наприклад, NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), NH<sub>2</sub>O-R<sup>i</sup>, R<sup>i</sup>NH-R<sup>i</sup>, NH<sub>2</sub>-R<sup>i</sup>), NH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>-C(=S)-NH<sub>2</sub>, тіосульфат (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), дитіоніт (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), фосфородитіоат (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(SH)(OH) або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту (R<sup>k</sup>C(=O)NHOH або сіль, утворену катіоном), гідазид (R<sup>k</sup>CONHNH<sub>2</sub>), формальдегідсульфоксилат (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H або сіль HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном, наприклад, HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>), глікозильований нуклеотид (наприклад, GDP-манозу), флударабін або їх суміш, де R<sup>i</sup> і R<sup>i</sup>, незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщені щонайменше одним замісником, вибраним із -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> і R<sup>i</sup>, необов'язково, можуть бути додатково заміщені замісником для алкілу, описаним тут; R<sup>i</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; а R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил (переважно R<sup>k</sup>

являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; більш переважно  $R^k$  являє собою метил, етил або пропіл), але не обмежуються ними. Переважно катіон являє собою одновалентний катіон, наприклад,  $Na^+$  або  $K^+$ . Переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, вибирають із сульфідів, гідроксиламіну, сечовини і гідразину. Більш переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, являє собою  $NaHSO_3$  або  $KHSO_3$ .

[79] Як використовується тут, якщо не зазначене інше, терміни "біогідролізовний амідний", "біогідролізовний складноефірний", "біогідролізовний карбаматний", "біогідролізовний карбонатний", "біогідролізовний уреїдний" і "біогідролізовний фосфатний аналог" означає амідний, складноефірний, карбаматний, карбонатний, уреїдний або фосфатний аналог, відповідно, який або: 1) не порушує біологічної активності сполуки і надає зазначеній сполуці вигідні властивості *in vivo*, наприклад, поглинання, тривалість дії або початок дії, або 2) сам по собі є біологічно неактивним, але перетворюється *in vivo* у біологічно активну сполуку. Приклади біогідролізовних амідів включають аміди нижчих алкілів, аміди  $\alpha$ -амінокислот, алкоксиациламіди та алкіламіноалкілкарбоніламіди, але не обмежуються ними. Приклади біогідролізовних складних ефірів включають складні ефіри нижчих алкілів, алкоксиацилоксиефіри, алкілациламіноалкілові складні ефіри та складні ефіри холіну, але не обмежуються ними. Приклади біогідролізовних карбаматів включають нижчі алкіламіни, заміщені етилендіаміни, амінокислоти, гідроксиалкіламіни, гетероциклічні та гетероароматичні аміни та поліефірні аміни, але не обмежуються ними. Особливо кращими проліками і солями проліків є проліки, які підвищують біодоступність сполук згідно з винаходом при введенні таких сполук в організм ссавця.

[80] Фраза "фармацевтично прийнятна сіль", як використовується тут, стосується фармацевтично прийнятних органічних або неорганічних солей сполуки згідно з даним винаходом. Типові солі включають сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромід, йодид, нітрат, бісульфат, фосфат, кислий фосфат, ізонікотинат, лактат, саліцилат, кислий цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, бітартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, форміат, бензоат, глутамат, метансульфонат "мезилат", етансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, памоат (тобто 1,1'-метилебис-(2-гідрокси-3-нафтоат)), солі лужних металів (наприклад, натрію і калію), солі лужноземельних металів (наприклад, магнію) і солі амонію, але не обмежуються ними. Фармацевтично прийнятні солі можуть містити включення іншої молекули, наприклад, ацетат-іону, сукцинат-іону або іншого протиіону. Протиіон може бути будь-якою органічною або неорганічною групою, яка стабілізує заряд вихідної сполуки. Крім того, фармацевтично прийнятна сіль може мати більше одного зарядженого атома у своїй структурі. У випадку, коли кілька заряджених атомів є частиною фармацевтично прийнятної солі, вона може містити декілька протиіонів. Таким чином, фармацевтично прийнятна сіль може мати один або більше заряджених атомів і/або один або більше протиіонів.

[81] Якщо сполука згідно з винаходом є основою, бажану фармацевтично прийнятну сіль можна одержати будь-яким підходящим способом, доступним у даній галузі техніки, наприклад, обробкою вільної основи неорганічною кислотою, наприклад, соляною кислотою, бромистоводневою кислотою, сірчаною кислотою, азотною кислотою, метансульфоновою кислотою, фосфорною кислотою і т.п., або органічною кислотою, наприклад, оцтовою кислотою, малеїною кислотою, бурштиною кислотою, мигдальною кислотою, фумаровою кислотою, малоновою кислотою, піровиноградною кислотою, щавлевою кислотою, гліколевою кислотою, саліциловою кислотою, піранозидною кислотою, наприклад, глюкуроною кислотою або галактуроною кислотою, альфа-гідрокси кислотою, наприклад, лимонною кислотою або винною кислотою, амінокислотою, наприклад, аспарагіною кислотою або глутаміною кислотою, ароматичною кислотою, наприклад, бензойною кислотою або коричною кислотою, сульфоною кислотою, наприклад, п-толуолсульфоною кислотою або етансульфоною кислотою і т.п.

[82] Якщо сполука згідно з винаходом є кислотою, бажану фармацевтично прийнятну сіль можна одержати будь-яким підходящим способом, наприклад, обробкою вільної кислоти неорганічною або органічною основою, наприклад, аміном (первинним, вторинним або третинним), гідроксидом лужного металу або гідроксидом лужноземельного металу і т.п. Ілюстративні приклади підходящих солей включають органічні солі, які є похідними амінокислот, наприклад, гліцину і аргініну, аміаку, первинних, вторинних і третинних амінів і циклічних амінів, наприклад, піперидину, морфоліну і піперазину, і неорганічні солі, які є похідними натрію, кальцію, калію, магнію, марганцю, заліза, міді, цинку, алюмінію і літію, але не обмежуються ними.

[83] Як використовується тут, термін "сольват" означає сполуку, яка додатково включає в

стехіометричних або нестехіометричних кількостях розчинник, наприклад, воду, ізопропанол, ацетон, етанол, метанол, ДМСО, етилацетат, оцтову кислоту та етаноламін, дихлорметан, 2-пропанол і т.п., зв'язаний за рахунок нековалентних міжмолекулярних сил. Сольвати або гідрати сполук легко одержати шляхом додавання щонайменше одного молярного еквівалента гідроксильного розчинника, наприклад, метанолу, етанолу, 1-пропанолу, 2-пропанолу або води до сполуки, яка приводить до сольватування або гідратування іміногрупи.

[84] "Метаболіт" є продуктом, отриманим за рахунок метаболізму зазначеної сполуки, її похідного або її кон'югату, або її солі в організмі. Метаболіти сполуки, її похідного або її кон'югату можна ідентифікувати за допомогою звичайних методик, відомих у даній галузі техніки, і визначити їх активність за допомогою тестів, наприклад, описаних тут. Такі продукти можуть утворюватися, наприклад, у результаті окиснення, гідроксилування, відновлення, гідролізу, амідування, дезамідування, етерифікації, деетерифікації, ферментативного розщеплення і т.п. введеної сполуки. Відповідно, даний винахід включає метаболіти сполук, їх похідних або їх кон'югату згідно з винаходом, включаючи сполуки, їх похідні або їх кон'югати, отримані способом, який включає здійснення контакту сполуки, її похідного або її кон'югату згідно з даним винаходом, із ссавцем протягом часу, достатнього для одержання його метаболічного продукту.

[85] Фраза "фармацевтично прийнятний" означає, що речовина або композиція повинні бути сумісні хімічно і/або токсикологічно з іншими інгредієнтами, які містяться у складі, і/або ссавцем, який піддається лікуванню з використанням речовини або композиції.

[86] Термін "захисна група" або "блокувальна група" стосується замітника, звичайно використовуюваного для блокування або захисту певної функціональної групи при взаємодії інших функціональних груп зі сполукою, її похідним або її кон'югатом. Наприклад, "амінозахисна група" або "аміноблокуюча група" є заміником, приєднаним до аміногрупи, який блокує або захищає функціональну аміногрупу у сполучі. Такі групи добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, P. Wuts and T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ) і представлені карбаматами, наприклад, метил- та етилкарбаматом, FMOC, заміщеними етилкарбаматами, карбаматами, які розщеплюються за допомогою 1,6- $\beta$ -елімінування (також називані "які жертвують собою"), похідними сечовини, амідами, пептидами, алкільними та арильними похідними. Підходящі аміноблокуючі групи включають ацетил, трифторацетил, трет-бутоксикарбоніл (BOC), бензилоксикарбоніл (CBZ) і 9-флуоренілметиленоксикарбоніл (Fmoc). Загальний опис захисних груп і їх використання див. в P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2007.

[87] Термін "група, яка відходить", стосується зарядженої або незарядженої групи, яка від'єднується під час заміни або заміщення. Такі групи, які відходять, добре відомі в даній галузі техніки і включають галогени, складні ефіри, алкокси, гідроксил, тозилати, трифлати, мезилати, нітрили, азид, карбамат, дисульфід, складні тіоефіри, прості тіоефіри та сполуки діазонію, але не обмежуються ними.

[88] Термін "біфункціональний зшиваючий агент", "біфункціональний лінкер" або "зшиваючий агент" стосується модифікуючих агентів, які володіють двома реакційноздатними групами, з'єднаними зі "зв'язуючою групою", одна з яких здатна взаємодіяти з агентом, який зв'язується із клітинами, а інша реагує із цитотоксичною сполукою, щоб приєднати зазначені дві молекули одна до одної. Такі біфункціональні агенти, які зшивають, добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Isalm and Dent in Bioconjugation chapter 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Наприклад, біфункціональні агенти, які зшивають, забезпечують приєднання за допомогою тіоефірного зв'язку, включають N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) для впровадження малеїмідогруп, або N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB) для впровадження йодацетильних груп. Інші біфункціональні агенти, які зшивають, впроваджують малеїмідні групи або галоацетильні групи в агент, який зв'язується із клітинами, добре відомі в даній галузі техніки (див. заявки на патент США 2008/0050310, 20050169933, доступні в Pierce Biotechnology Inc., п/с 117, Рокленд, штат Іллінойс 61105, США) і включають біс-малеїмідполіетилєнгліколь (BMPEO), BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-( $\beta$ -малеїмідпропілокси)сукцинімідний ефір (BMPS), N-сукцинімідильний ефір  $\gamma$ -малеїмідмасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідний ефір  $\epsilon$ -малеїмідокапронової кислоти (EMCS), NHS 5-малеїмідвалеріанової кислоти, HBVS, N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідметил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроат), який являє собою "довголанцюговий" аналог SMCC (LC-SMCC), м-малеїмідбензоїл-N-гідроксисукцинімідний ефір (MBS), гідразид або сіль HCl і 4-(4-N-малеїмідфеніл)-масляної кислоти (MPBH), N-сукцинімідил-3-(бромацетамідо)пропіонат (SBAP), N-сукцинімідилйодоацетат (SIA), N-сукцинімідильний ефір к-малеїмідундеканової кислоти

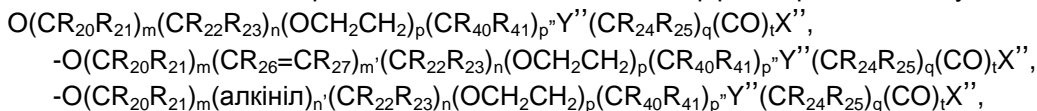
(KMUА), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідфеніл)-бутират (SMPB), сукцинімідил-6-(β-малеїмідпропіонамід)гексаноат (SMPH), сукцинімідил-(4-винілсульфоніл)бензоат (SVSB), дитіобіс-малеїмідетан (DTME), 1,4-біс-малеїмідбутан (BMB), 1,4-біс-малеїмідил-2,3-дигідроксибутан (BMDB), біс-малеїмідгексан (BMH), біс-малеїмідетан (BMOE),  
 5 сульфосукцинімідил-4-(N-малеїмідметил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), сульфосукцинімідил(4-йодацетил)амінобензоат (сульфо-SIAB), м-малеїмідбензоїл-N-гідроксисульфосукцинімідний ефір (сульфо-MBS), N-(γ-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідний ефір (сульфо-GMBS), N-(ε-малеїмідкапроїлокси)сульфосукцинімідний ефір (сульфо-EMCS), N-(κ-малеїмідундеканоїлокси)сульфосукцинімідний ефір (сульфо-KMUS) і сульфосукцинімідил-4-(п-малеїмідфеніл)бутират (сульфо-SMPB), але не обмежуються ними.

[89] Гетеробіфункціональні агенти, які зшивають, є біфункціональними агентами, які зшивають і які мають дві різні реакційноздатні групи. Гетеробіфункціональні агенти, які зшивають і які містять N-гідроксисукцинімідну групу (NHS-групу), здатну взаємодіяти з аміногрупами, і гідразинову групу, здатну взаємодіяти з карбонільними групами, також можна використовувати для сполуки цитотоксичних сполук, описаних тут, з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитіла). Приклади таких комерційно доступних гетеробіфункціональних зшиваючих агентів включають гідрозон сукцинімідил-6-гідразиннікотинамиду ацетону (SANH), гідрохлорид сукцинімідил-4-гідразидтерефталату (SHTH) і гідрохлорид сукцинімідилгідразиннікотинату (SHNH). Кон'югати, які несуть кислотно-лабільний зв'язок, також можна одержати з використанням гідразин-несучого похідного бензодіазепіну згідно із даним винаходом. Приклади біфункціональних зшиваючих агентів, які можна використовувати, включають сукцинімідил-п-формілбензоат (SFB) і сукцинімідил-п-формілфеноксиацетат (SFPA).

[90] Біфункціональні зшиваючі агенти, які забезпечують приєднання агента, який зв'язується з клітинами, з цитотоксичними сполуками за допомогою дисульфідних зв'язків, включають N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноат, а також інші агенти, відомі в даній галузі техніки, які включають N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноат (SPP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноат (SPDB), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), для впровадження дитіопіридилних груп. Інші біфункціональні агенти, які зшивають, які можна використовувати для впровадження дисульфідних груп, відомі в даній галузі техніки і описані в патентах США 6913748, 6716821 і публікаціях патентів США 20090274713 і 20100129314, усі з яких включені в даний опис за допомогою посилання. В альтернативному випадку також можна використовувати агенти, які зшивають, наприклад, 2-імінотіолан, гомоцистеїнтіолактон або S-ацетилбурштиновий ангідрид, які впроваджують тіолові групи.

[91] "Лінкер", "лінкерна група" або "зв'язуюча група", як визначено тут, стосується групи, яка з'єднує дві групи, наприклад, агент, який зв'язує клітини, і цитотоксичну сполуку один з одним. Біфункціональний агент, який зшиває, може включати дві реакційноздатні групи, по одній на кожному з кінців лінкерної групи, такої, що одна реакційноздатна група може спочатку взаємодіяти із цитотоксичною сполукою, забезпечуючи сполуку, яка несе лінкер і другу реакційноздатну групу, яка потім може взаємодіяти з агентом, який зв'язується із клітинами. В альтернативному випадку один кінець біфункціонального зшиваючого агента може спочатку взаємодіяти з агентом, який зв'язується із клітинами, який несе лінкерну групу і другу реакційноздатну групу, яка потім може взаємодіяти із цитотоксичною сполукою. Зв'язуюча група може містити хімічний зв'язок, який забезпечує вивільнення цитотоксичної групи, у конкретному положенні. Підходящі хімічні зв'язки добре відомі в даній галузі техніки і включають дисульфідні зв'язки, тіоефірні зв'язки, кислотолабільні зв'язки, фотоллабільні зв'язки, пептидазоллабільні зв'язки та естеразоллабільні зв'язки (див., наприклад, патенти США 5208020, 5475092, 6441163, 6716821, 6913748, 7276497, 7276499, 7368565, 7388026 і 7414073). Кращими є дисульфідні зв'язки, тіоефірні та пептидазоллабільні зв'язки. Інш лінкери, які можна використовувати у даному винаході, включають нерозщепні лінкери, наприклад, детально описані в публікації патенту США номер 20050169933, або заряджені лінкери, або гідрофільні лінкери, і описані в US 2009/0274713, US 2010/01293140 і WO 2009/134976, кожен з яких спеціально включений в даний документ шляхом посилання.

[92] В одному варіанті втілення зв'язуюча група з реакційноздатною групою, приєднаною до одного кінця, такою як реакційноздатний складний ефір, вибрана із наступного "Списку 1": -



- $-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{піперазин})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{пірол})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-O(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
5  $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{алкініл})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{піперазин})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{пірол})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-S(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
10  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{алкініл})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{піперазин})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{пірол})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
15  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(\text{алкініл})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(\text{піперазин})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
20  $-(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(\text{алкініл})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
 $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_nA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ ,  
25 де: m, n, p, q, m', n', t 'являють собою цілі числа від 1 до 10, або, необов'язково, дорівнюють 0; t, m', n' і p 'дорівнюють 0 або 1; X'' вибраний із OR<sub>36</sub>, SR<sub>37</sub>, NR<sub>38</sub>R<sub>39</sub>, де R<sub>36</sub>, R<sub>37</sub>, R<sub>38</sub>, R<sub>39</sub> являє собою H або лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 20 атомів вуглецю, і/або мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , R<sub>37</sub>, необов'язково, являє собою тіол-блокуючу групу, якщо t = 1, COX'' утворює реакційноздатний складний ефір, вибраний із N-гідроксисукцинімідних ефірів, N-гідроксифталімідних ефірів, N-гідроксисульфосукцинімідних ефірів, пара-нітрофенілових ефірів, динітрофенілових ефірів, пентафторфенілових ефірів і їх похідних, причому указанні похідні полегшують утворення амідного зв'язку; Y'' відсутня або вибрана із O, S, S-S або NR<sub>32</sub>, де R<sub>32</sub> відповідає визначенню, наведеному вище для R, або, якщо Y'' не являє собою S-S і t = 0, X'' вибраний із малеїмідогрупи, галоацетильної групи або SR<sub>37</sub>, де R<sub>37</sub> відповідає вищенаведеному визначенню; A'' являє собою амінокислоту, вибрану із гліцину, аланіну, лейцину, валіну, лізину, цитруліну і глутамату, або поліпептид, який містить від 2 до 20 амінокислот; R<sub>20</sub>, R<sub>21</sub>, R<sub>22</sub>, R<sub>23</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>25</sub>, R<sub>26</sub> і R<sub>27</sub> є однаковими або різними і являють собою H або лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 5 атомів вуглецю; R<sub>29</sub> і R<sub>30</sub> є однаковими або різними і являють собою H або алкіл, який містить від 1 до 5 атомів вуглецю; R<sub>33</sub> являє собою H або лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 12 атомів вуглецю, мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , або R<sub>33</sub> являє собою -COR<sub>34</sub>, -CSR<sub>34</sub>, -SOR<sub>34</sub>, або -SO<sub>2</sub>R<sub>34</sub>, де R<sub>34</sub> являє собою H або лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 20 атомів вуглецю, або мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ ; і одна із R<sub>40</sub> і R<sub>41</sub> являє собою, необов'язково, негативно або позитивно заряджену функціональну групу, а інша являє собою H або алкіл, алкеніл, алкініл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю.

[93] Термін "амінокислота" стосується природної амінокислоти або неприродної амінокислоти, представленої  $NH_2-C(R^{aa}R^{aa})-C(=O)OH$ , де кожна із R<sup>aa</sup> і R<sup>aa</sup>, незалежно, являє собою H, необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероарил або гетероцикліл. Термін "амінокислота" також стосується відповідного залишку, коли з N- і/або C-кінця амінокислоти вилучений один атом водню, наприклад,  $-NH-C(R^{aa}R^{aa})-C(=O)O-$ .

[94] Термін "катион" стосується іону з позитивним зарядом. Катион може бути одновалентним (наприклад, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> і т.д.), двовалентним (наприклад, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> і т.д.) або полівалентним

(наприклад,  $\text{Al}^{3+}$  і т.д.). Переважно катіон є одновалентним.

[95] Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість активної сполуки або кон'югату, яка викликає бажану біологічну реакцію у суб'єкта. Така реакція включає полегшення симптомів захворювання або розладу, який підлягає лікуванню, запобігання, інгібування або затримку рецидиву симптому захворювання або самого захворювання, збільшення тривалості життя суб'єкта у порівнянні з відсутністю лікування або запобігання, інгібування або затримку прогресування симптому захворювання або самого захворювання. Визначення ефективної кількості перебуває в межах можливостей фахівців у даній галузі техніки, особливо у світлі наведеного тут докладного опису. Токсичність і терапевтичну ефективність сполуки і можна визначити за допомогою стандартних фармацевтичних процедур у культурах клітин і на експериментальних тваринах. Ефективна кількість сполуки або кон'югату згідно з даним винаходом або іншого терапевтичного агента, який підлягає введенню суб'єктові, залежить від стадії, категорії і стану множинної мієломи і характеристик суб'єкта, наприклад, загального стану здоров'я, віку, статі, маси тіла і витривалості до ліків. Ефективна кількість сполуки або кон'югату згідно з даним винаходом або іншого терапевтичного агента, який підлягає введенню, також залежить від шляху введення і дозованої лікарської форми. Кількість та інтервал дозування можна регулювати індивідуально, забезпечуючи рівні активної сполуки в плазмі, достатні для підтримки бажаного терапевтичного ефекту.

[96] Термін "група, здатна взаємодіяти з тіолами" стосується функціональної групи, взаємодіючої з тіоловою групою. Приклади груп, здатних взаємодіяти з тіолами, включають малеїмідо, вінілпіридин, вінілсульфон, вінілсульфонамід, групу на основі галоацетилю (наприклад, галоацетамідо) або дисульфід (наприклад,  $-\text{SSR}^d$ , де  $\text{R}^d$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, феніл, нітрофеніл, динітрофеніл, карбоксинітрофеніл, піридил, 2-нітропіридил, 4-нітропіридил або 3-карбокси-4-нітропіридил), але не обмежуються ними.

[97] Термін "реакційноздатний складний ефір" стосується складного ефіру, який містить групу, яка відходить, легко витісняється аміногрупою або гідроксильною групою. Приклади реакційноздатних складних ефірів включають N-гідроксисукцинімідний ефір, N-гідроксисульфосукцинімідний ефір, нітрофеніловий ефір, динітрофеніловий ефір, тетрафторфеніловий ефір, сульфотетрафторфеніловий ефір і пентафторфеніловий ефір. Переважно реакційноздатний складний ефір є N-гідроксисукцинімідним (NHS) ефіром.

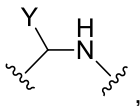
[98] Термін "імін-вмісна лікарська речовина" або "імін-вмісна цитотоксична сполука" стосується сполуки, описаної тут (без лінкерної групи), яка містить щонайменше одну імінну функціональну групу. Переважно імін-вмісна лікарська речовина містить одну імінну функціональну групу.

Способи згідно з даним винаходом

[99] У першому аспекті даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію цитотоксичної сполуки з модифікованим CBA за pH приблизно від 4 до 9, причому:

а) модифікований CBA включає залишок біфункціонального зшиваючого агента, зв'язаного з CBA, а зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну взаємодіяти з тіолом; і

б) цитотоксична сполука включає тіолову групу і групу, представлену наступною структурою:



де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3$ ,  $\text{HSO}_2$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетратіофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^+$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^+\text{Na}^-$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^j$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів

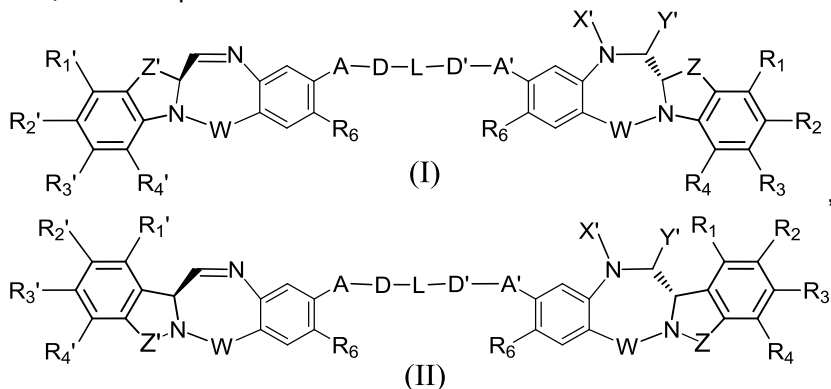
вуглецю;  $R^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил.

[100] У деяких варіантах втілення цитотоксичну сполуку одержують взаємодією імін-вмісної цитотоксичної сполуки, яка несе тіолову групу, з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами.

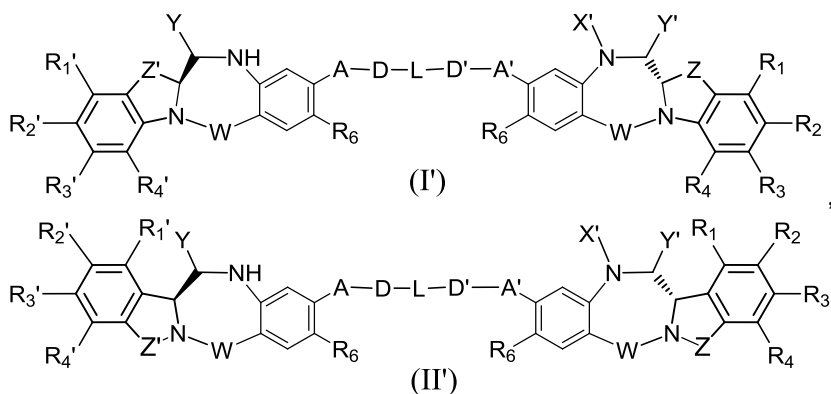
5 [101] У деяких варіантах втілення спосіб може додатково включати очищення цитотоксичної сполуки до взаємодії з модифікованим СВА.

[102] У деяких варіантах втілення

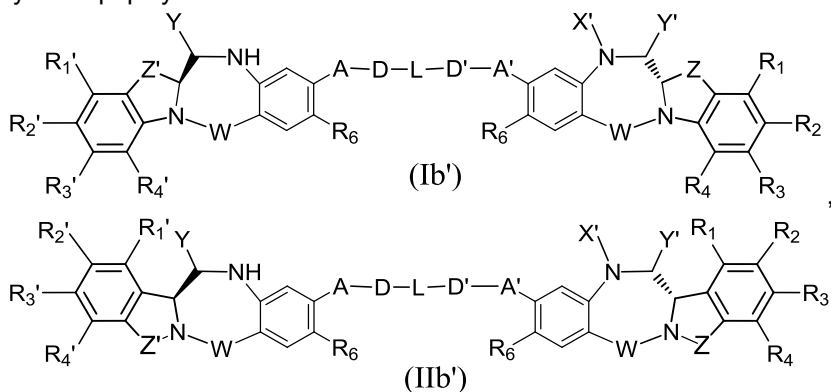
(1) імін-вмісна цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



(2) цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



(3) цитотоксична сполука і фрагмент зв'язуючої групи кон'югату представлені однією з наступних формул:



де:

$X$  вибрана із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;



Y' вибрана із -H, оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

R<sup>c</sup> являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, галогену, гуанідинію [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонамідів, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup> і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub> або галоген;

Z і Z', незалежно, вибрані із -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>- і -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-;

n і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

L відсутня або, якщо присутня, включає тілову групу і являє собою мономер поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є необов'язково заміщеним;

де щонайменше одна із X', Y', R<sub>6</sub>, R<sup>c</sup>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>', L (наприклад, за допомогою необов'язково заміщеної групи) приєднана до зв'язуючої групи в формулах (Ib') або (IIb').

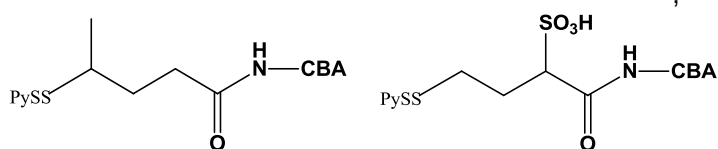
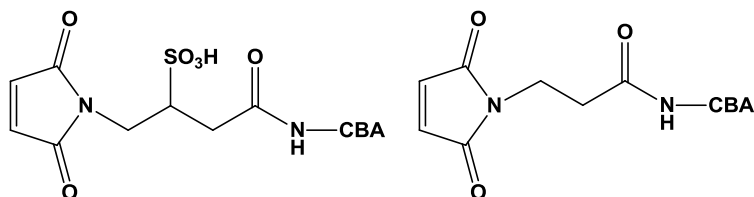
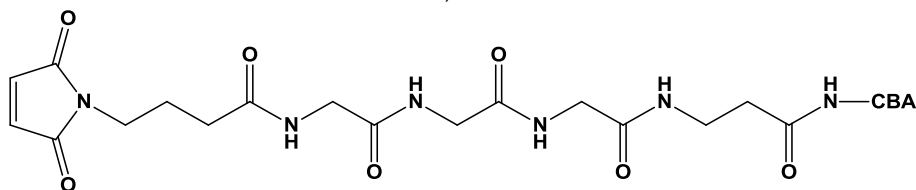
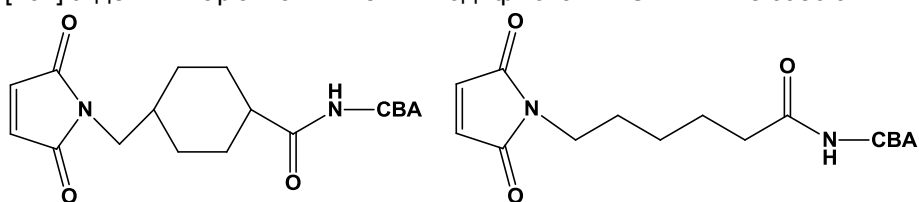
[103] У деяких варіантах втілення модифікований CBA одержують взаємодією CBA з біфункціональним агентом, який зшиває, причому зазначений біфункціональний агент, який зшиває, містить групу, здатну взаємодіяти з тіолами, і групу, здатну взаємодіяти з CBA, обидва, приєднані до зв'язуючої групи.

5 [104] У деяких варіантах втілення група, здатна взаємодіяти з CBA, реагує з аміногрупою CBA (наприклад, аміногрупою бічного ланцюга Lys) або з тіоловою групою CBA (наприклад, тіоловою групою бічного ланцюга Cys).

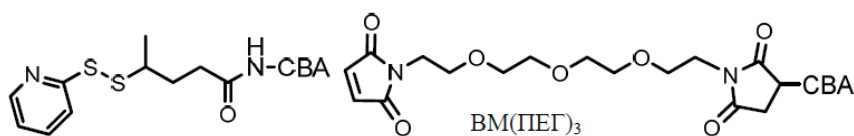
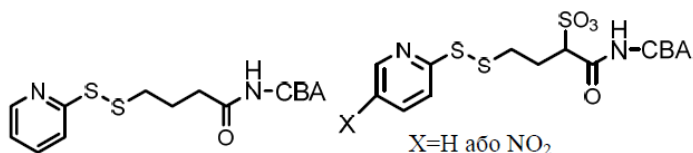
10 [105] У деяких варіантах втілення група, здатна взаємодіяти з тіолами, вибрана із групи, яка складається з малеїмідо, вінілпіридину, вінілсульфону, вінілсульфонамїду, групи на основі галоацетилю і дисульфідної групи.

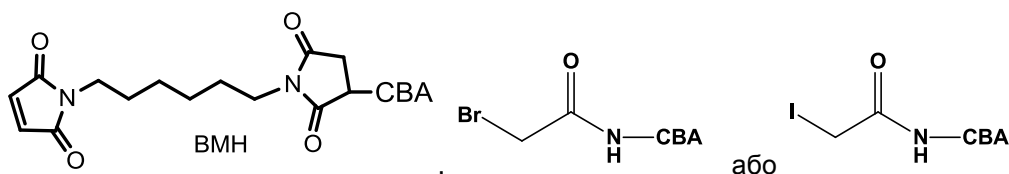
[106] У якості альтернативи група, здатна взаємодіяти з тіолами, може бути малеїмідо, галоацетамїдо або  $-SSR^d$ , де  $R^d$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, феніл, нітрофеніл, динітрофеніл, карбоксинітрофеніл, піридил, 2-нітропіридил, 4-нітропіридил або 3-карбокси-4-нітропіридил.

15 [107] У деяких варіантах втілення модифікований CBA являє собою:



20





[108] Типова схема реакції показана на Фіг. 8, де на "першому етапі" реагент, здатний взаємодіяти з імінами (показаний на схемі реакції у вигляді нуклеофіла (Nuc:)), додають до лікарської речовини, яка містить тіол, і забезпечують взаємодію та утворення модифікованої лікарської речовини, яка несе тіолову групу. Модифіковану лікарську речовину, необов'язково, очищають із метою видалення надлишку реагенту, здатного взаємодіяти з імінами. На "другому етапі" антитіло модифікують лінкером, який містить групу X, здатну взаємодіяти з тіолами (малеїмід, SSPy, вінілсульфон і т.д.), і піддають взаємодії з модифікованою лікарською речовиною, яка несе тіолову групу, за pH 6-9, одержуючи стабільний дисульфідний або тіоефірний зв'язок між лікарською речовиною та антитілом. На "третьому етапі" видаляють побічні продукти (наприклад, надлишок реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, модифікованої лікарської речовини, який не прореагував з антитілом, і т.д.) і формують сполуку на основі кон'югату. Кількість молекул лікарської речовини, кон'югованих з антитілом, дорівнює n і може становити, наприклад, 1-10.

[109] Типовий приклад способу двоетапного кон'югування описаний на Фіг. 16, де антитіло спочатку модифікують біфункціональним зшиваючим агентом, одержуючи антитіло, яке має бажану кількість лінкерів, придатних для взаємодії з димерною сполукою, яка має вільну тіолову групу. У зазначеному прикладі антитіло huMy9-6 спочатку модифікували SPDB, одержуючи антитіло з лінкерами, які містять дитіопіридилову групу. Потім модифіковане антитіло піддавали впливу вільного тіолу, наприклад, 2a, одержуючи необхідний кон'югат huMy9-6-SPDB-2a. Додаткові підходящі лінкери, здатні взаємодіяти з тіолами, які можна використовувати в аналогічних реакціях, включені у Фіг. 16.

[110] Реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною, яка несе тіолову групу, в органічному розчиннику (наприклад, диметилацетаміді, диметилформаміді, диметилсульфоксиді, ацетонітрилі, етанолі, метанолі, метиленхлориді, хлороформі, диоксані або їх суміші) або суміші води (наприклад, деіонізованої води) і одного або більше органічних розчинників. При використанні тільки органічного розчинника реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною за кімнатної температури на 30 хв. або довше (наприклад, приблизно 1 година, приблизно 2 години, приблизно 3 години, приблизно 4 години, приблизно 5 годин, приблизно 10 годин, приблизно 24 години або до завершення реакції). Кращий час інкубування/реакції становить приблизно 0-4 години або 1-3 години. Отриману суміш можна негайно використовувати для взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом), модифікованим групою, здатною взаємодіяти з тіолами, у буфері за pH від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до приблизно 9. У якості альтернативи суміш можна заморозити і зберігати, наприклад, за -20 °C або -80 °C, і використовувати пізніше при збереженні його здатності взаємодіяти з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом). Якщо використовують суміш води і органічного розчинника(ів) у якості системи змішуваних співрозчинників (наприклад, води і диметилацетаміду), реакційну суміш лікарської речовини і реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, використовують негайно або зберігають у замороженому вигляді до використання після змішування з метою взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами, який несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами. Якщо використовують суміш води і органічного розчинника(ів) у якості системи незмішуваних співрозчинників (наприклад, води і метиленхлориду), лікарську речовину і реагент, здатний взаємодіяти з імінами, змішують на 10 хв. або довше (наприклад, приблизно 30 хвилин, приблизно 1 година, приблизно 2 години, приблизно 5 годин, приблизно 10 годин, приблизно 24 години або до завершення реакції), збирають водний шар, оцінюють в ньому кількість лікарської речовини та реакційноздатного тіолу (наприклад, УФ-спектроскопією та аналізом за Елманом з DTNB-реагентом (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойною кислотою))) і додають до агента, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитіла), який несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами, у буфері за pH від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до приблизно 9.

[111] У другому аспекті даний винахід забезпечує спосіб одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію CBA з імін-вмісною цитотоксичною сполукою, реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, і біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, з утворенням кон'югату.

[112] У деяких варіантах втілення агент, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитіло) приводять у контакт із лікарською речовиною (наприклад, імін-вмісною цитотоксичною сполукою) і реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, з утворенням першої суміші; а потім першу суміш приводять у контакт із біфункціональним зшиваючим агентом з утворенням кон'югату агент, який зв'язується із клітинами/лікарська речовина. Переважно біфункціональний зшиваючий агент приводять у контакт із першою сумішшю безпосередньо після утворення першої суміші. У якості альтернативи першу суміш витримували протягом інтервалу часу (наприклад, приблизно 1-10 хвилин, приблизно 10-30 хвилин, приблизно від 30 хвилин до 1 години, приблизно від 1 до 5 годин, приблизно від 5 до 24 годин або приблизно від 1 до 2 днів) до контакту з біфункціональним агентом, який зшиває.

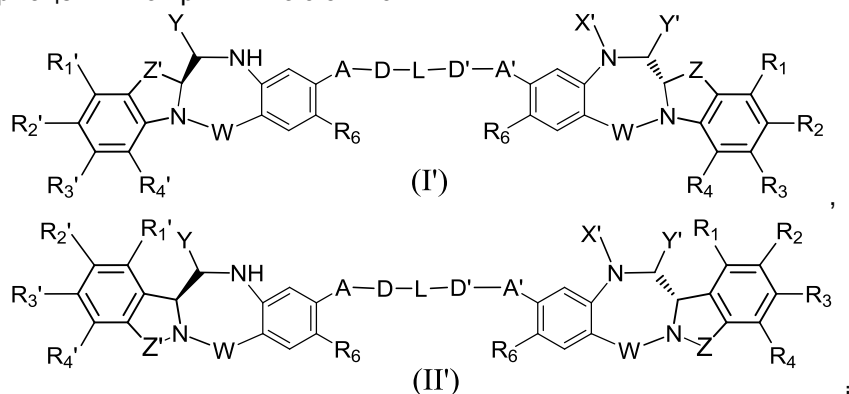
[113] У деяких варіантах втілення зазначений спосіб може додатково включати очищення кон'югату.

[114] Типова схема реакції показана на Фіг. 10, де на "першому етапі" реагент, здатний взаємодіяти з імінами (показаний на схемі реакції у вигляді нуклеофіла (Nuc:)), додають до СВА (наприклад, антитіла), лікарської речовини, яка містить тіол, біфункціонального зшиваючого агента, який містить як групу X, здатну взаємодіяти з тіолами (малеїмід, SSPy, вінілсульфон і т.д.), так і реакційноздатну складноєфірну групу, і забезпечують протікання реакції за рН 6-9, одержуючи стабільний кон'югат лікарська речовина/антитіло. На "другому етапі" видаляють побічні продукти (наприклад, надлишок реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, модифікованої лікарської речовини, яка не прореагувала з антитілом і т.д.) і формують сполуку на основі кон'югату. Кількість молекул лікарської речовини, кон'югованих з антитілом, дорівнює n і може становити, наприклад, 1-10.

[115] У третьому аспекті даний винахід забезпечує спосіб одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (СВА), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, спосіб, який включає:

а) взаємодію цитотоксичної сполуки з біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, групу, яка реагує з СВА (наприклад, тіолову групу, малеїмідну групу, галоацетамідну групу або аміногрупу), і групу, здатну взаємодіяти із цитотоксичною сполукою з утворенням модифікованої цитотоксичної сполуки, ковалентно зв'язаної із залишком біфункціонального зшиваючого агента, причому зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну реагувати з СВА;

причому цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_2^-$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагіофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^j$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який

має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;

X 'вибрана із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y 'вибрана із -H, оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, який має від 1 до 6 гетероатомів;

$R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

кожна із  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонамідів, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub> або галоген;

Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ ;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

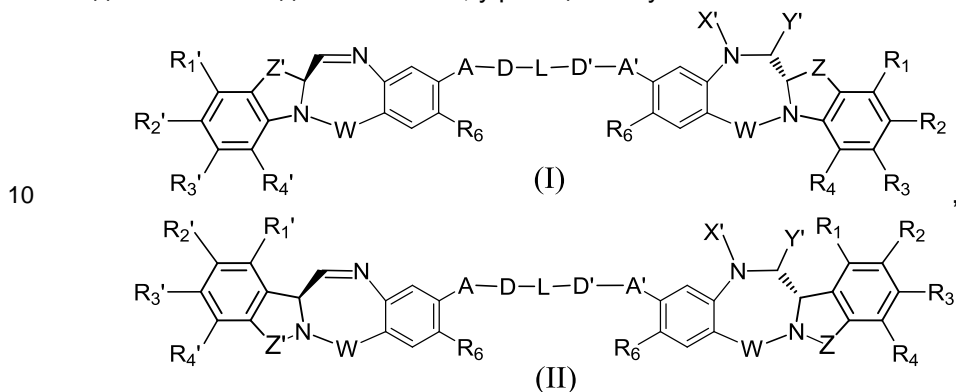
D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

L відсутня або, якщо присутня, включає тілову групу або являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який

має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є необов'язково заміщеним; і

б) взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з СВА за допомогою групи, здатної взаємодіяти з СВА, за рН від приблизно 4 до приблизно 9, з утворенням кон'югату.

[116] У деяких варіантах втілення цитотоксичну сполуку одержують за рахунок взаємодії імін-вмісної цитотоксичної сполуки, яка несе тіолову групу наступних формул, з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, у реакційній суміші



[117] У деяких варіантах втілення зазначений спосіб може додатково включати очищення цитотоксичної сполуки перед етапом а).

15 [118] У деяких варіантах втілення зазначений спосіб може додатково включати очищення модифікованої цитотоксичної сполуки перед етапом б).

[119] У деяких варіантах втілення реакційну суміш зберігають у замороженому вигляді до відтавання замороженої суміші і проведення етапу а).

20 [120] У деяких варіантах втілення зазначений спосіб може додатково включати зберігання реакційної суміші, отриманої на етапі а), у замороженому вигляді до відтавання і проведення етапу б).

[121] У деяких варіантах втілення біфункціональний зшиваючий агент є біс-малеїмідогексаном або BMPEO.

25 [122] Типова схема реакції показана на Фіг. 11, де на "першому етапі" реагент, здатний взаємодіяти з імінами (показаний на схемі реакції у вигляді нуклеофіла (Nuc:)), додають до цитотоксичної сполуки, яка містить тіол. Отриману цитотоксичну сполуку, необов'язково, очищають перед взаємодією цитотоксичної сполуки на "другому етапі" з біфункціональним зшиваючим агентом (наприклад, біс-малеїмідогексаном або BMPEO), одержуючи другу модифіковану лікарську речовину, яка несе групу, яка взаємодіє з тіолами. Потім на "третьому етапі" додають тіол-вмісний СВА (наприклад, антитіло) і забезпечують протікання реакції (рН 6-9), одержуючи стабільний кон'югат лікарська речовина/антитіло. На "четвертому етапі" видаляють побічні продукти (наприклад, надлишок реагенту, здатного до взаємодії з імінами, модифікованої лікарської речовини, яка не прореагувала з антитілом і т.д.) і формують сполуку на основі кон'югату. Кількість молекул лікарської речовини, кон'югованих з антитілом, дорівнює n і може становити, наприклад, 1-10.

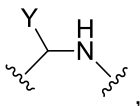
35 [123] Реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною, яка несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами, в органічному розчиннику (наприклад, диметилацетаміді, диметилформаміді, диметилсульфоксиді, ацетонітрилі, етанолі, метанолі, метиленхлориді, хлороформі, диоксані або їх суміші) або суміші води (наприклад, деіонізованої води) і одного або більше органічних розчинників. При використанні тільки органічного розчинника реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною за кімнатної температури на 30 хв. або довше (наприклад, приблизно 1 година, приблизно 2 години, приблизно 3 години, приблизно 4 години, приблизно 5 годин, приблизно 10 годин, приблизно 24 години або до завершення реакції). Кращий час інкубування/реакції становить приблизно 0-4 години або 1-3 години. Отриману суміш можна негайно використовувати для взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом), модифікованим групою, здатною взаємодіяти з тіолами, у буфері за рН від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до приблизно 9. У якості альтернативи суміш можна заморозити і зберігати, наприклад, за -20 °C або -80 °C, і використовувати пізніше при збереженні її здатності взаємодіяти з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом). Якщо

використовують суміш води і органічного розчинника(ів) у якості системи, співрозчинників, які змішуються (наприклад, води та диметилацетаміду), реакційну суміш лікарської речовини і реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, використовують негайно після змішування або зберігають у замороженому вигляді до використання з метою взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами, який несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами. Якщо використовують суміш води і органічного розчинника(ів) як систему незмішуваних співрозчинників (наприклад, води і метиленхлориду), лікарську речовину і реагент, здатний взаємодіяти з імінами, змішують на 10 хв. або довше (наприклад, приблизно 30 хвилин, приблизно 1 годину, приблизно 2 години, приблизно 5 годин, приблизно 10 годин, приблизно 24 години або до завершення реакції), збирають водний шар, оцінюють в ньому кількість лікарської речовини (наприклад, УФ-спектроскопією) і додають до агента, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитіла), який несе тіолову групу, у буфері за pH від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до приблизно 9.

[124] У четвертому аспекті даний винахід стосується способу одержання кон'югату, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з CBA за pH приблизно від 4 до 9, причому модифікована цитотоксична сполука включає:

а) залишок біфункціонального зшиваючого агента, зв'язаний із цитотоксичною сполукою і який включає зв'язуючу групу і реакційноздатну групу, вибрану з реакційноздатного складного ефіру та групи, здатної взаємодіяти з тіолами, і

б) групу, представлену:



де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_2^-$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_2$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^i$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил.

[125] У деяких варіантах втілення модифіковану цитотоксичну сполуку одержують шляхом взаємодії реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, з імін-вмісною цитотоксичною сполукою, яка несе зв'язуючу групу і реакційноздатну групу.

[126] У деяких варіантах втілення зазначений спосіб може додатково включати очищення модифікованої цитотоксичної сполуки до взаємодії з CBA.

[127] У деяких варіантах втілення реакційноздатний складний ефір може бути вибраний із групи, який складається з N-гідроксисукцинімідного ефіру, N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру, нітрофенілового ефіру, динітрофенілового ефіру, тетрафторофенілового ефіру, сульфотетрафторофенілового ефіру і пентафторофенілового ефіру. Переважно реакційноздатний складний ефір є N-гідроксисукцинімідним ефіром.

[128] У деяких варіантах втілення група, здатна взаємодіяти з тіолами, може бути вибрана із групи, яка складається з малеїмідо, вінілпіридину, вінілсульфону, вінілсульфонаміду, групи на основі галоацетилю і дисульфідної групи.

[129] У деяких варіантах втілення група, здатна взаємодіяти з тіолами, може бути малеїмідо, галоацетамідо або  $-\text{SSR}^d$ , де  $\text{R}^d$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, феніл, нітрофеніл, динітрофеніл, карбоксинітрофеніл, піридил, 2-нітропіридил, 4-нітропіридил або 3-карбокси-4-нітропіридил.

[130] Типова схема реакції показана на Фіг. 7, де на "першому етапі" реагент, здатний взаємодіяти з імінами (показаний на схемі реакції у вигляді нуклеофіла ( $\text{Nuc}^:$ )), додають до

лікарської речовини, яка містить реакційноздатний складний ефір (1с), і забезпечують взаємодію з утворенням модифікованої лікарської речовини. Модифіковану лікарську речовину, необов'язково, можна очистити з метою видалення надлишку реагенту, здатного взаємодіяти з імінами. На "другому етапі" модифіковану лікарську речовину з реакційноздатним складним ефіром піддають взаємодії з антитілом у буфері за рН 6-9. На "третьому етапі" видаляють побічні продукти (наприклад, надлишок реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, модифікованої лікарської речовини, яка не прореагувала з антитілом і т.д.), і формують сполуку на основі кон'югату. Кількість молекул лікарської речовини, кон'югованих з антитілом, дорівнює  $n$  і може становити, наприклад, 1-10.

[131] Ще одна схема реакції, яка зображує типовий спосіб згідно з даним винаходом, показана на Фіг. 9. На "першому етапі" до лікарської речовини, яка містить групу, здатну взаємодіяти з тіолами (де R є малеїмідною групою, SSPy і т.д.), додають реагент, здатний взаємодіяти з імінами, і забезпечують їх взаємодію і утворення модифікованої лікарської речовини. Модифіковану лікарську речовину, необов'язково, очищають із метою видалення надлишку реагенту, здатного взаємодіяти з імінами. На "другому етапі" модифіковану лікарську речовину піддають взаємодії з антитілом, яке містить реакційноздатний тіол, утворюючи кон'югат антитіло/лікарська речовина, який має антитіло, ковалентно зв'язане з лікарською речовиною за допомогою стабільного дисульфідного або тіоефірного зв'язку. Антитіла з реакційноздатною тіоловою групою можна одержати описаними тут способами, наприклад, шляхом відновлення міжланцюгових дисульфідних зв'язків, генетичним кодуванням цистеїну або шляхом модифікації антитіл лінкерами, які містять тіоли або хімічно замасковані тіоли. На "третьому етапі" видаляють лікарську речовину, яка не прореагувала з антитілами, і формують сполуку на основі кон'югату. Кількість молекул лікарської речовини, кон'югованих з антитілом, дорівнює  $n$  і може становити, наприклад, 1-10.

[132] Реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною, яка несе активований складний ефір (наприклад, N-гідроксисукцинімідний ефір, пентафторофеноловий ефір, сульфо-N-гідроксисукцинімідний ефір) в органічному розчиннику (наприклад, диметилацетаміді, етанолі, метиленхлориді, хлороформі, диоксані або їх суміші) або суміші води (наприклад, деіонізованої води) і одного або більше органічних розчинників. При використанні тільки органічного розчинника реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна змішати з лікарською речовиною за температури 0-100 °C, переважно - за температури 0-30 °C, більш переважно - за кімнатної температури на 5 хв. або довше (наприклад, приблизно 30 хв., 1 година, приблизно 2 години, приблизно 3 години, приблизно 4 години, приблизно 5 годин, приблизно 10 годин, приблизно 24 години або до завершення реакції). Кращий час інкубування/реакції становить приблизно 0-4 години або 1-3 години. Отриману реакційну суміш можна негайно використовувати для взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом), у буфері за рН від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до приблизно 9. У якості альтернативи реакційну суміш можна заморозити і зберігати, наприклад, за температури приблизно -20 °C або -80 °C і використовувати пізніше при збереженні її здатності взаємодіяти з антитілом. Переважно очищення проміжних продуктів не потрібне. При використанні суміші води і органічного розчинника як системи змішуваних співрозчинників (наприклад, води і диметилацетаміду), суміш лікарської речовини і реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, використовують негайно після змішування або зберігають у замороженому вигляді до взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами (наприклад, антитілом). При використанні суміші води і органічного розчинника як системи незмішуваних співрозчинників (наприклад, води і метиленхлориду), лікарську речовину і реагент, здатний взаємодіяти з імінами, змішують на 10 хв. або довше, збирають водний шар, оцінюють в ньому кількість лікарської речовини і додають до агента, який зв'язується з клітинами (наприклад, антитіла), у буфері за рН від приблизно 4 до приблизно 9, переважно - від приблизно 6 до 9.

[133] У кожному з вищевказаних аспектів можна використовувати підходящу кількість реагенту, здатного взаємодіяти з імінами. Наприклад, можна використовувати від приблизно 0,1 до приблизно 30 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами. Переважно можна використовувати від приблизно 1 до приблизно 10 молярних еквівалентів, більш переважно - від приблизно 1 до приблизно 5 молярних еквівалентів, а ще більш переважно - від приблизно 3 до приблизно 5 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами.

[134] Використовуючи зазначену загальну процедуру в будь-якому з вищеописаних аспектів можна використовувати будь-який з наступних реагентів, здатних взаємодіяти з імінами: сульфіти ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_2$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфати ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_3$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_3$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складні



ефіри тіофосфату  $((R^iO)_2PS(OR^i), R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H)$ , різні аміни (гідроксиламін (наприклад,  $NH_2OH$ ), гідазин (наприклад,  $NH_2NH_2$ ),  $NH_2O-R^i$ ,  $R^{i'}NH-R^i$ ,  $NH_2-R^i$ ),  $NH_2-CO-NH_2$ ,  $NH_2-C(=S)-NH_2$ , тіосульфат ( $H_2S_2O_3$  або сіль  $S_2O_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $H_2S_2O_4$  або сіль  $S_2O_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат  $(P(=S)(OR^k)(SH)(OH))$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту  $(R^kC(=O)NHOH)$  або сіль, утворену катіоном), гідазид  $(R^kCONHNH_2)$ , формальдегідсульфоксилат ( $HOCH_2SO_2H$  або сіль  $HOCH_2SO_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,  $HOCH_2SO_2Na^+$ ), глікозильований нуклеотид (наприклад, GDP-манозу), флударабін або їх суміш, де  $R^i$  і  $R^{i'}$ , незалежно, являють собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщені щонайменше одним замінником, вибраним із  $-N(R^j)_2$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SO_3H$  і  $-PO_3H$ ;  $R^i$  і  $R^{i'}$ , необов'язково, можуть бути додатково заміщені замінником для алкілу, описаним тут;  $R^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; а  $R^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероциклік або гетероарил (переважно  $R^k$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; більш переважно  $R^k$  являє собою метил, етил або пропіл). Переважно катіон являє собою одновалентний катіон, наприклад,  $Na^+$  або  $K^+$ .

[135] Переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, вибирають із сульфідів (наприклад,  $NaHSO_3$  або  $KHSO_3$ ), гідроксиламіну, гідазину і сечовини. Більш переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, є  $NaHSO_3$  або  $KHSO_3$ .

[136] В одному варіанті втілення модифіковані лікарські речовини, описані в будь-якому з вищевказаних аспектів, очищають перед взаємодією з агентом, який зв'язується із клітинами. Для очищення модифікованої лікарської речовини можна використовувати будь-які підходящі способи, відомі в даній галузі техніки. Наприклад, модифікований препарат можна очистити за допомогою колонкової хроматографії (наприклад, хроматографії на силікагелі) або ВЕРХ.

[137] У ще одному варіанті втілення кон'югат агент, який зв'язується із клітинами /лікарська речовина, отриманий відповідно до будь-якого з вищеописаних аспектів, очищають за допомогою тангенціальної проточної фільтрації, адсорбційної хроматографії, адсорбційної фільтрації, вибіркового осадження, неадсорбційної фільтрації або їх комбінації. Для очищення кон'югатів переважно використовують тангенціальну проточну фільтрацію (TFF, також відому як фільтрація в тангенціальному потоці, ультрафільтрація та діафільтрація) і/або смоли для адсорбційної хроматографії.

[138] Можна використовувати будь-які підходящі системи TFF, у тому числі системи типу Pellicon (Millipore, Білеріка, штат Массачусетс, США), систему Sartoclon Cassette (Sartorius AG, Еджвуд, Нью-Йорк, США) і систему типу Centrasette (Pall Corp., Іст-Хілз, штат Нью-Йорк, США).

[139] Можна використовувати будь-яку підходящу смолу для адсорбційної хроматографії. Кращі смоли для адсорбційної хроматографії включають смоли для хроматографії на гідроксиапатиті, гідрофобної хроматографії з індукцією заряду (HCIC), гідрофобної хроматографії (HIC), іонообмінної хроматографії, іонообмінної хроматографії змішаного типу, афінної хроматографії з використанням іммобілізованих металів (IMAC), хроматографії барвник-ліганд, афінної хроматографії, обернено-фазової хроматографії і їх комбінацій. Приклади підходящих смол на основі гідроксиапатиту включають керамічний гідроксиапатит (СНТ I типу і II типу, Bio-Rad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США), гідроксиапатит HA Ultrogel (Pall Corp., Іст-Хілз, штат Нью-Йорк, США) і керамічний фтороапатит (CFT I типу і II типу, Bio-Rad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США). Прикладом підходящої смоли для HCIC є смола MEPR Hypercel (Pall Corp., Іст-Хілз, штат Нью-Йорк, США). Приклади підходящих смол для HIC включають смоли Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose і Octyl Sepharose (всі від компанії GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США), а також смоли Macro-prep Methyl і Macro-Prep t-Butyl (Biorad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США). Приклади підходящих іонообмінних смол включають смоли SP-Sepharose, CM-Sepharose і Q-Sepharose (всі від компанії GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США), а також смолу Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США). Приклади підходящих іонообмінників змішаного типу включають смолу Bakerbond ABx (JT Baker, Філіпсбург, штат Нью-Джерсі, США). Приклади підходящих IMAC-смол включають смолу Chelating Sepharose (GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США) і смолу Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США). Приклади підходящих барвник-лігандних смол включають смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США) і смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Херкуліз, штат Каліфорнія, США). Приклади підходящих афінних смол включають смолу Protein A Sepharose (наприклад, MabSelect, GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США), де агент, який зв'язується з клітинами, являє собою антитіло, і лектинові афінні смоли, наприклад, смолу Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США),

де агент, який зв'язується з клітинами, несе сайти зв'язування відповідного лектину. Як альтернативу можна використовувати антитіло, специфічне до агента, який зв'язується з клітинами. Таке антитіло можна іммобілізувати, наприклад, на смолі Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Піскатауей, штат Нью-Джерсі, США). Приклади підходящих обернено-фазових смол

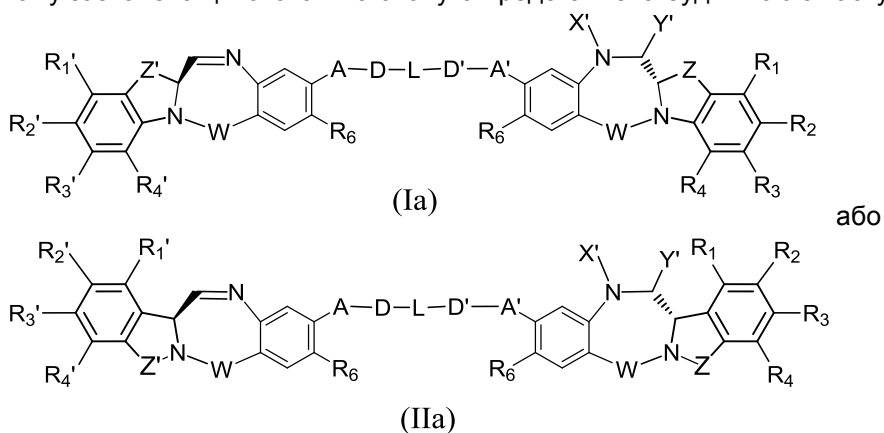
включають смоли C4, C8 і C18 (Grace Vydac, Хесперія, штат Каліфорнія, США).  
 [140] У способах згідно із даним винаходом можна використовувати будь-яку підходящу смолу для неабсорбційної хроматографії. Приклади підходящих хроматографічних смол включають смоли SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (наприклад, S-200 і S-300), смоли SUPERDEX™ (наприклад, SUPERDEX™ 75 і SUPERDEX™ 200), смоли BIO-GEL® (наприклад, P-6, P-10, P-30, P-60 і P-100) та інші смоли, відомі фахівцям у даній галузі техніки, але не обмежуються ними.

Лікарські речовини, які несуть зв'язуючу групу

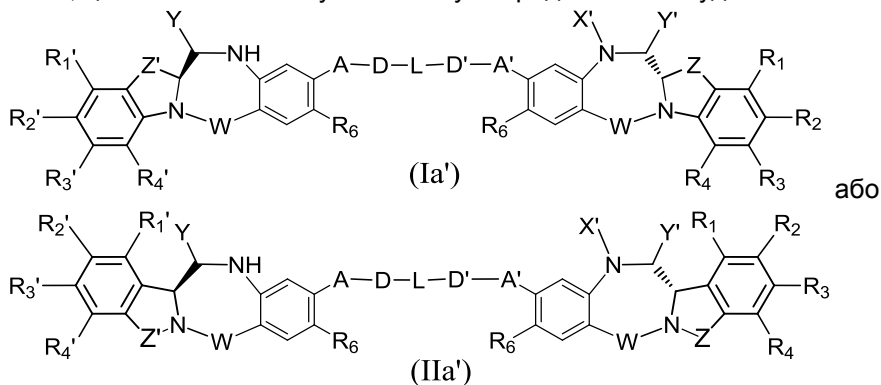
[141] Лікарські речовини, які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом, включають сполуки, описані в US2010/0316656, US 2010/003641, US2010/0203007, усі з яких включені в даний опис за допомогою посилання.

[142] У деяких інших варіантах втілення цитотоксичні сполуки, які можна кон'югувати із агентами, які зв'язуються із клітинами, за допомогою зв'язуючої групи, не містять зв'язуючої групи. Замість цього для кон'югування цитотоксичної сполуки, яка не має лінкера, з СВА за допомогою лінкерної групи може бути потрібен біфункціональний зшиваючий реагент (який включає зв'язуючу групу).

[143] Так, у першому специфічному варіанті втілення лікарська речовина, ковалентно з'єднана зі зв'язуючою групою за допомогою приєднаної до неї реакційноздатної групи, яку можна використовувати у способах згідно з даним винаходом (наприклад, в одноетапному реагентному способі, як описано вище в четвертому аспекті даного винаходу) або яка може бути проміжним продуктом способів згідно з даним винаходом (наприклад, способу, описаного в третьому аспекті даного винаходу), є цитотоксичною сполукою, яка несе реакційноздатну групу, наприклад, реакційноздатний складний ефір або групу, здатну взаємодіяти з тілами (узагальнено "реакційноздатну групу"), яка включає зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою, здатною ковалентно зв'язувати цитотоксичну сполуку із СВА, причому зазначена цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або їх фармацевтично прийнятною сіллю. Після взаємодії з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, цитотоксична сполука може бути представлена будь-якою з наступних формул:



де:

- Y являє собою сульфїт ( $\text{HSO}_3$ ,  $\text{HSO}_2$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфїт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетратіофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородітіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^+$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}^+$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замінником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^i$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замінником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;
- X 'вибрана із  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ , амін-блокуючої групи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- Y 'вибрана із  $-\text{H}$ , оксогрупи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;
- $\text{R}^c$  являє собою  $-\text{H}$  або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;
- кожна із  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_1'$ ,  $\text{R}_2'$ ,  $\text{R}_3'$  і  $\text{R}_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ , галогену, гуанідинію  $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NCO}$ ,  $-\text{NR}'\text{COR}''$ ,  $-\text{SR}$ , сульфоксиду, представленого  $-\text{SOR}'$ , сульфону, представленого  $-\text{SO}_2\text{R}'$ , сульфонату  $-\text{SO}_3^+\text{M}^+$ , сульфату  $-\text{OSO}_3^+\text{M}^+$ , сульфонамїду, представленого  $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ціаногрупи, азидної групи,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$  і зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою;
- R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- кожна із  $\text{R}'$  і  $\text{R}''$ , незалежно, вибрана із  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{COR}$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, який має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- n являє собою ціле число від 1 до 24;
- W вибрана із  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{S}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{BH}$ ,  $\text{SO}$  і  $\text{SO}_2$ ;
- $\text{R}_6$  являє собою  $-\text{H}$ ,  $-\text{R}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{SR}$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$ , галоген або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;
- Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(\text{CH}_2)_{n'}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{n'a'}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{n'a'}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{n'a'}$  і  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n'a'}$ ;
- n і n'a є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;
- $\text{R}_7$  і  $\text{R}_8$  є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,

-NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

5  $R_9$ , незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо  $(-C(=O)-)$ , -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR<sub>5</sub> і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

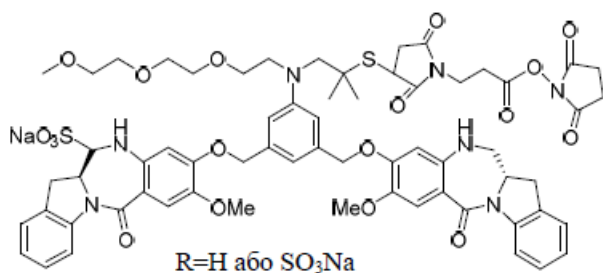
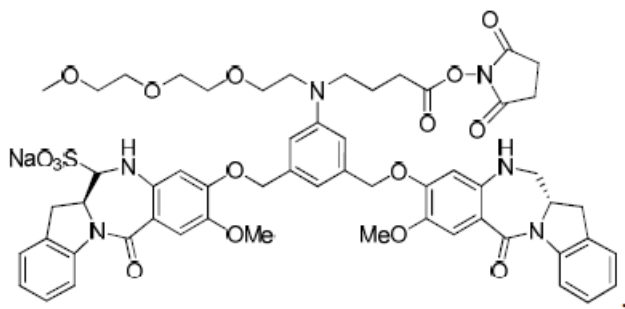
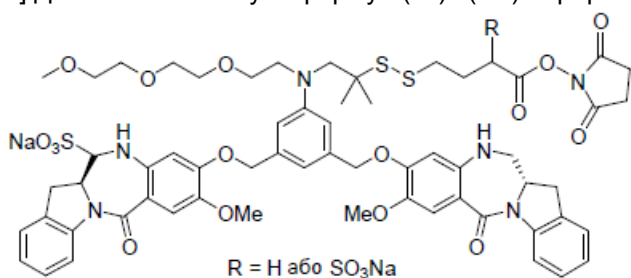
10  $R_5$ , в будь-якому випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

15 L відсутня, являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл або алкеніл, необов'язково, заміщені зв'язуючою групою з приєднаною до неї реакційноздатною групою, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце можуть бути, необов'язково, заміщені, причому замітник може являти собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою.

25 Переважно L відсутня або вибрана із необов'язково заміщеної фенільної групи і необов'язково заміщеної піридинильної групи, де фенільна і піридинильна група несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, або L являє собою аміногрупу, яка несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (тобто -N(зв'язуюча група)-), або L являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою.

[144] Деякі типові сполуки формул (Ia') і (IIa') перераховані нижче:



[145] У деяких варіантах втілення

X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою і аміно-блокуючої групи. Переважно X' являє собою -H, -OH, -Me або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою. Більш переважно X' являє собою -H;

Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Переважно Y' вибрана із -H або оксогрупи. Більш переважно Y' являє собою -H;

W являє собою C=O;

кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із -H, -NR'R'', -NR'(C=O)R, -OR, -SR, -NO<sub>2</sub> і зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою. Переважно одна із R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' і R<sub>3</sub>' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, а інші є -H;

R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або фенілу;

R' і R'' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, -OH, -OR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або фенілу;

R<sub>6</sub> являє собою -OR<sup>c</sup> або -SR<sup>c</sup>, де R<sup>c</sup> являє собою -H, лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю. Переважно R<sub>6</sub> являє собою -OMe або -SMe. Ще більш переважно R<sub>6</sub> являє собою -OMe;

Z і Z' є -CH<sub>2</sub>-;

A і A' є однаковими або різними і вибрані із -O-, -S-, -NR<sub>5</sub> і оксогрупи (C=O). Переважно A і A' є однаковими або різними і вибрані із -O- і -S-. Більш переважно A і A' є -O-;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 24, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, або лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, де алкіл, алкеніл і алкініл, необов'язково, заміщені одним або більше (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 або більше) заміників, незалежно вибраних із групи, яка складається із галогену, -OR, -NR'COR'', -SR і COR';

переважно D і D' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Більш переважно D і D' являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю. Ще більше переважно D і D' є однаковими або різними і вибрані із лінійного алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

L відсутня або вибрана із необов'язково заміщеної фенільної групи і необов'язково заміщеної піридинної групи, де фенільна і піридинна група несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, або L являє собою аміногрупу, яка несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (тобто -N(зв'язуюча група)-), або L являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і несе зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою.

[146] У другому специфічному варіанті втілення для цитотоксичних димерів (Ia) або (IIa) змінні описані нижче:

W являє собою C=O;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub> і R<sub>4</sub>' є -H;

одна із R<sub>3</sub> або R<sub>3</sub>', необов'язково, являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, а інша являє собою -H;

R<sub>6</sub> являє собою -OMe;

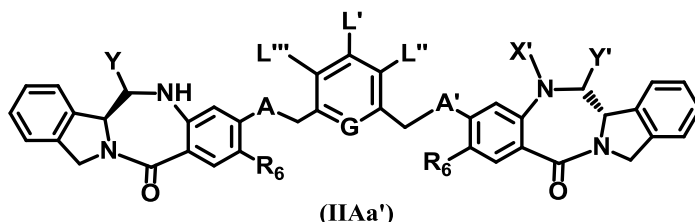
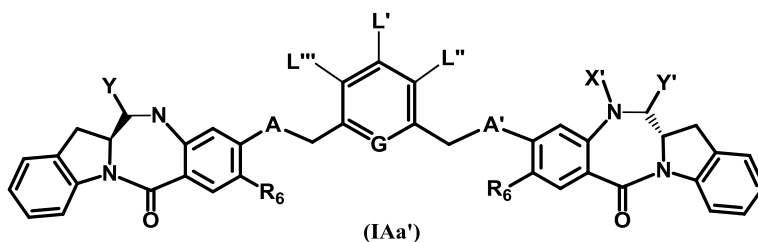
Z і Z' є -CH<sub>2</sub>-;

X' являє собою -H;

Y' являє собою -H;

A і A' є -O-; а інші змінні відповідають опису у першому специфічному варіанті втілення.

[147] У третьому специфічному варіанті втілення цитотоксичні димери (з'єднані зі зв'язуючою групою за допомогою приєднаної до неї реакційноздатної групи) формули (Ia') і (IIa') представлені наступними формулами:



де:

X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу і аміно-блокуючої групи. Переважно X' являє собою -H, -OH або -Me. Більш переважно X' являє собою -H;

Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Переважно Y' вибрана із -H або -Me. Більш переважно Y' являє собою -H;

L', L'' і L''' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_nR^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub><sup>+</sup>M<sup>+</sup>, сульфонамід, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -CONR'R'' і зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, за умови, що тільки одна із L', L'' і L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою. Переважно L' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою. Як альтернатива одна із L', L'' або L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, в той час як інші є -H. Більш переважно L' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, а L'' і L''' є -H;

R<sub>6</sub> являє собою -OR<sup>c</sup> або -SR<sup>c</sup>, де R<sup>c</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю. Переважно R<sub>6</sub> являє собою -OMe або -SMe. Ще більш переважно R<sub>6</sub> являє собою -OMe;

A і A' вибрані із -O- і -S-. Переважно A і A' є -O-;

R являє собою -H, необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або ПЕГ-групу  $(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ;

n являє собою ціле число від 1 до 24; і

R<sup>c</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

R' і R'' є однаковими або різними і вибрані із -H, -OH, -OR, -NRR<sup>g</sup>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із O, S, N і P, ПЕГ-групи  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , де n являє собою ціле число від 1 до 24, переважно n дорівнює 2, 4 або 8; а R<sup>g</sup> являє собою -H, необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або ПЕГ-групу  $(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ;

G вибрана із -CH- або -N-; а інші змінні відповідають опису в першому специфічному варіанті втілення.

[148] У четвертому специфічному варіанті втілення цитотоксичних димерів формули (IAa') або (IIAa') L' представлена формулою:

-W'-R<sup>x</sup>-V-R<sup>y</sup>-J,

де:

W' і V є однаковими або різними і кожна із них, незалежно, відсутня або вибрана із  $-\text{CR}^e\text{R}^e$ -,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e$ -,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ ,  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ ,  $-\text{SS}-$  або  $-\text{C}(=\text{O})-$ , або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

$\text{R}^x$  і  $\text{R}^y$  є однаковими або різними і кожна із них, незалежно, відсутня або являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

$\text{R}^e$  і  $\text{R}^e$  є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , де  $\text{R}^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, і необов'язково несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-\text{NHR}^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $\text{R}^{101}$  і  $\text{R}^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна  $\text{R}^{101}$  і  $\text{R}^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

n являє собою ціле число від 1 до 24; і

J включає реакційноздатну групу, зв'язану з нею, і вибрана із малеїміду, галоацетамідо,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SSR}^d$ ,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ,  $-\text{CH}(\text{Me})\text{SH}$ ,  $-\text{C}(\text{Me})_2\text{SH}$  і  $-\text{COE}$ , де  $-\text{COE}$  являє собою реакційноздатний складний ефір, вибраний із N-гідроксисукцинімідного ефіру, N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру, нітрофенілового (наприклад, 2- або 4-нітрофенілового) ефіру, динітрофенілового (наприклад, 2,4-динітрофенілового) ефіру, сульфотетрафторофенілового (наприклад, 4-сульфо-2,3,5,6-тетрафторофенілового) ефіру і пентафторофенілового ефіру, але не обмежується ними, а  $\text{R}^{c1}$  являє собою -H або заміщений або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, і

$\text{R}^d$  вибрана із фенілу, нітрофенілу (наприклад, 2- або 4-нітрофенілу), динітрофенілу (наприклад, 2- або 4-нітрофенілу), карбоксинітрофенілу (наприклад, 3-карбокси-4-нітрофенілу), піридилу або нітропіридилу (наприклад, 4-нітропіридилу).

[149] Переважно J є  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SSR}^d$ , малеїмідом або N-гідроксисукцинімідним ефіром.

[150] Переважно  $\text{R}^e$  являє собою -H або -Me;  $\text{R}^e$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ; n являє собою ціле число від 2 до 8; переважно  $\text{R}^k$  являє собою -H, -Me або  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NMe}_2$ , а інші змінні відповідають опису, наведеному вище в третьому специфічному варіанті втілення.

[151] У ще одному кращому варіанті втілення V є амінокислотою або пептидом, який має від 2 до 8 амінокислот. Більш переважно V є валін-цитруліном, gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu.

[152] У ще одному кращому варіанті втілення W' являє собою  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$  або  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ;  $\text{R}^e$  являє собою -H, лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ;  $\text{R}^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; V відсутня або являє собою  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ;  $\text{R}^y$  відсутня або являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а J являє собою  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SSR}^d$  або  $-\text{COE}$  (переважно N-гідроксисукцинімідний ефір). Інші змінні відповідають опису в четвертому специфічному варіанті втілення.

[153] У ще одному кращому варіанті втілення W' являє собою  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$  або  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ;  $\text{R}^e$  являє собою H, -Me або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{Me}$ ; n являє собою ціле число від 2 до 6;  $\text{R}^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; V і  $\text{R}^y$  відсутні; а J являє собою  $-\text{COE}$ , переважно N-гідроксисукцинімідний ефір.

[154] У п'ятому специфічному варіанті втілення L' представлена наступною формулою:

$-\text{W}'-[\text{CR}_1\text{R}_2]_a-\text{V}-[\text{Cu}]_{0-1}-[\text{CR}_3\text{R}_4]_b-\text{COE}$ ,

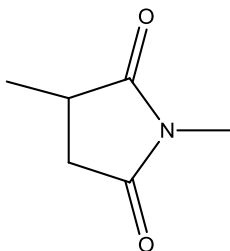
де:

кожна із  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  і  $\text{R}_3$ , незалежно, являє собою -H або -Me;

$\text{R}_4$  являє собою -H, -Me,  $-\text{SO}_3\text{H}$  або  $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ , де  $\text{M}^+$  являє собою фармацевтично прийнятний катіон;

a являє собою ціле число від 0 до 2, b являє собою ціле число від 0 до 3; а

Su являє собою, необов'язково, заміщене 5-членне гетероциклічне кільце, яке несе гетероатом N, переважно Su являє собою



[155] У деяких варіантах втілення, наприклад, у четвертому або п'ятому специфічних варіантах втілення,  $W' \in -N(R^e)$ .

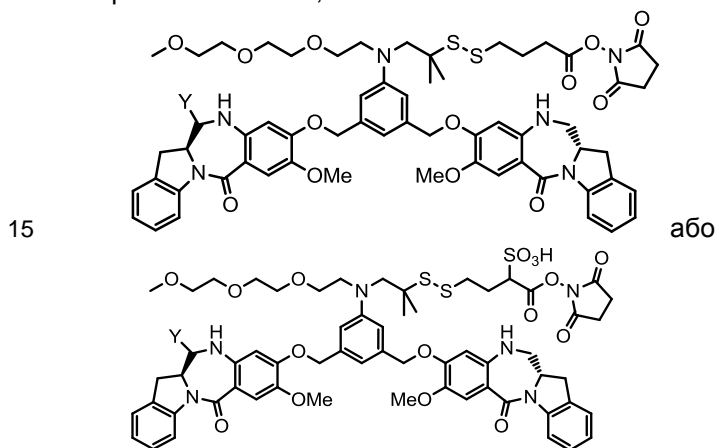
[156] У деяких варіантах втілення, наприклад, у четвертому або п'ятому специфічних  
5 варіантах втілення, R<sup>e</sup> являє собою -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>- R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний,  
розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[157] У деяких варіантах втілення, наприклад, у четвертому або п'ятому специфічних варіантах втілення. В є -S- або -SS-.

10 [158] У шостому специфічному варіанті втілення L', наприклад, як і в четвертому або п'ятому специфічних варіантах втілення, представлена наступною формулою:

$$-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-[CR_3''R_4'']_b-COE.$$

[159] У деяких варіантах втілення цитотоксична сполука, з'єднана зі зв'язуючою групою за допомогою реакційноздатної групи, приєднаної до неї, як в 4-му, 5-му і 6-му специфічних варіантах втілення, являє собою:

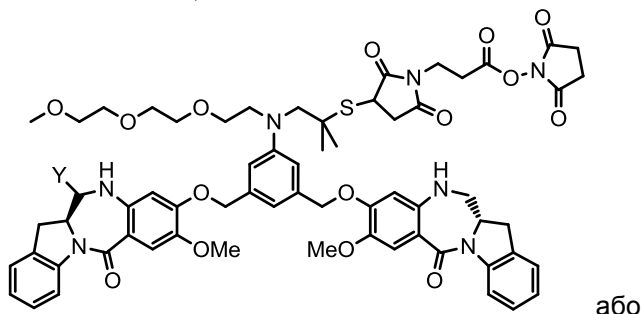


де Y є -SO<sub>3</sub>M, а M є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

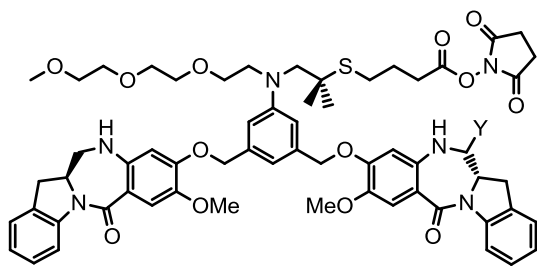
[160] У сьомому специфічному варіанті втілення L', наприклад, як і в четвертому, п'ятому або шостому специфічних варіантах втілення, представлена наступною формулою:

20  $-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-Cy-[CR_3''R_4'']_b-COE.$

[161] У деяких варіантах втілення цитотоксична сполука, з'єднана зі зв'язуючою групою за допомогою реакційноздатної групи, приєднаної до неї, як в 4-му, 5-му і 7-му специфічних варіантах втілення, являє собою:

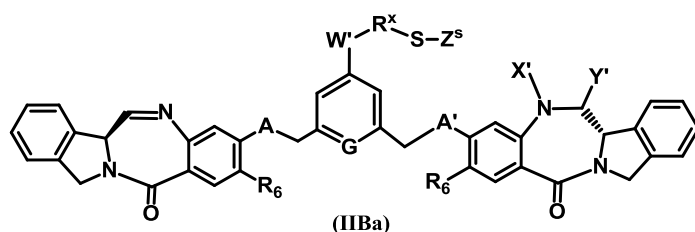
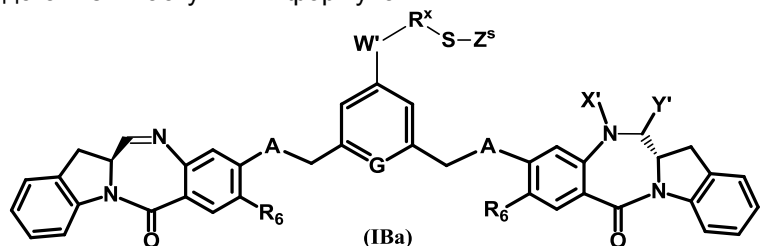






де Y є -SO<sub>3</sub>M, а M є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

[162] У восьмому специфічному варіанті втілення цитотоксичні сполуки формули (Ia) і (IIa) представлені наступними формулами:



де:

W' відсутня або вибрана із -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S- або -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-

R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sup>e</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад, -NHR<sup>101</sup>) або третинну аміногрупу (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Переважно кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

Z<sup>s</sup> являє собою -H, -SR<sup>m</sup>;

R<sup>m</sup> являє собою R<sup>d</sup> або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю і який несе реакційноздатний складний ефір, вибраний із N-гідроксисукцинімідних ефірів, N-гідроксифталімідних ефірів, N-гідроксисульфосукцинімідних ефірів, пара-нітрофенілових ефірів, динітрофенілових ефірів, пентафторфенілових ефірів;

R<sup>d</sup> вибрана із фенілу, нітрофенілу, динітрофенілу, карбоксинітрофенілу, піридилу або нітропіридилу;

n являє собою ціле число від 1 до 24, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище в четвертому специфічному варіанті втілення.

[163] Переважно R<sup>k</sup> є -H або -Me, а n є цілим числом від 2 до 8. Переважно R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище у п'ятому специфічному варіанті втілення.

[164] У деяких варіантах втілення для сполук формули (IBa) і (IIBa), описаних у восьмому специфічному варіанті втілення, змінні відповідають опису, наведеному нижче:

X' і Y' обидва є -H;

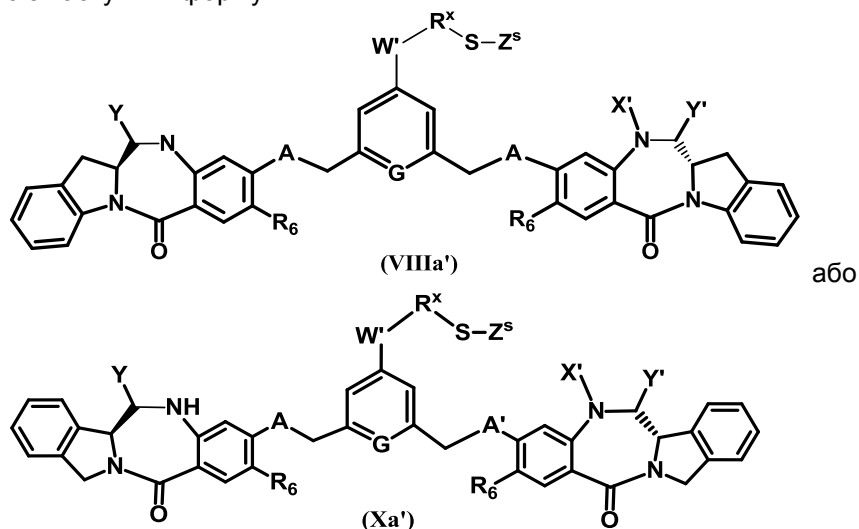
A і A' обидва є -O-;

R<sub>6</sub> є -OMe;

R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище у восьмому специфічному варіанті втілення.

[165] Переважно  $R^x$  являє собою  $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ , де кожна із  $R^f$  і  $R^g$ , незалежно, вибрана із H або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; p дорівнює 0, 1, 2 або 3. Більш переважно  $R^f$  і  $R^g$  є однаковими або різними і вибрані із -H і -Me, а p дорівнює 1.

[166] У дев'ятому специфічному варіанті втілення цитотоксична сполука, з'єднана зі зв'язуючою групою за допомогою приєднаної до неї реакційноздатної групи, представлена будь-якою з наступних формул:



де:

Y вибрана із  $-SO_3M$ ,  $-SO_2M$  або  $-OSO_3M$ ;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад,  $Na^+$  або  $K^+$ ;

X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу і аміно-блокуючої групи;

Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

A і A' вибрані із -O- і -S-;

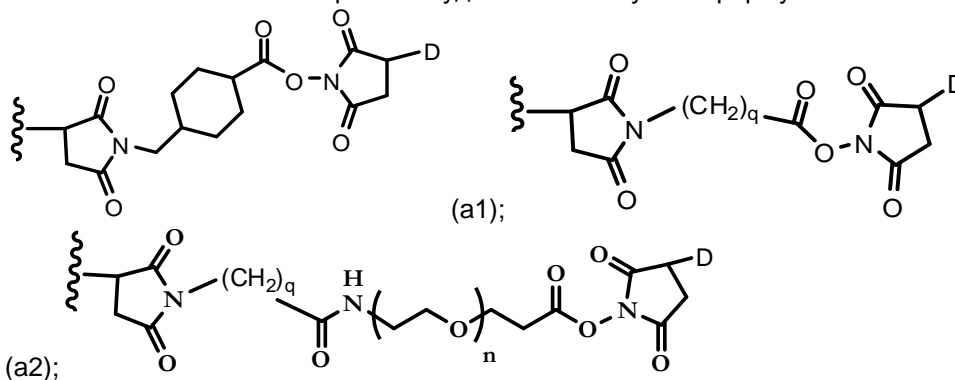
W' відсутня або вибрана із -O-,  $-N(R^e)-$ ,  $-N(R^e)-C(=O)-$ ,  $-N(C(=O)R^e)-$ , -S- або  $-CH_2-S-$ ,  $-CH_2NR^e-$ ;

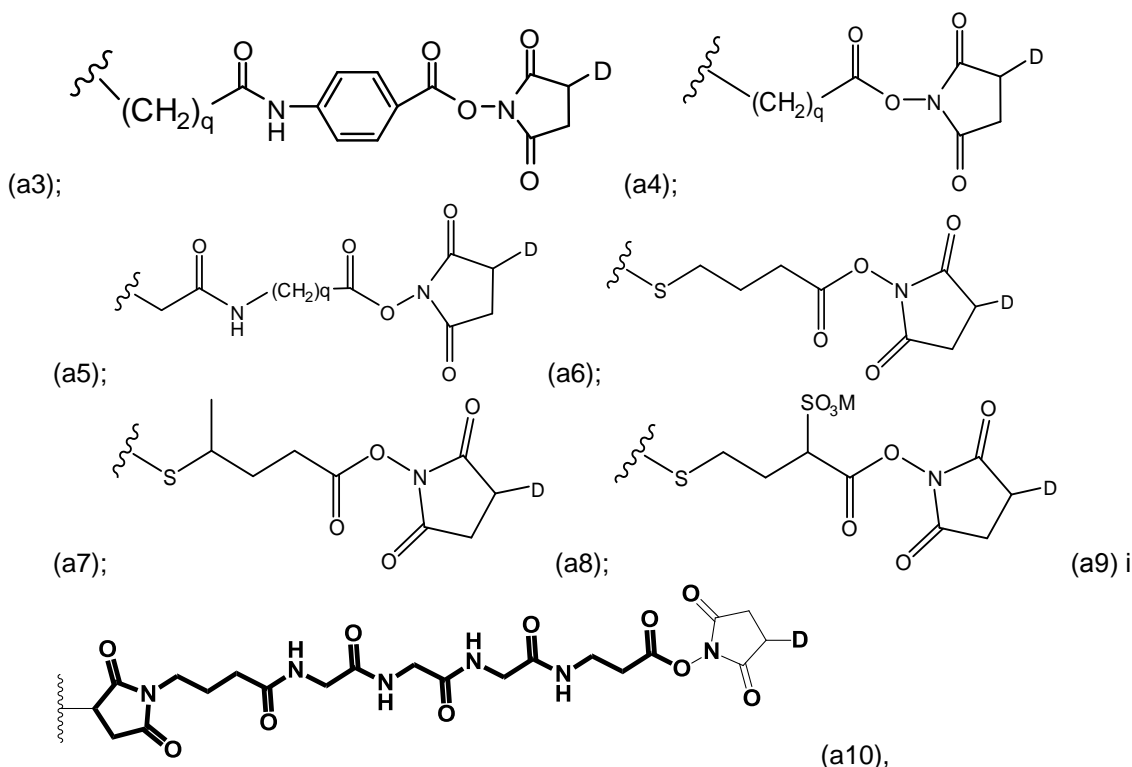
$R^x$  відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

$R^e$  являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-NHR^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-NR^{101}R^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $R^{101}$  і  $R^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

G вибрана із -CH- або -N-;

$Z^s$  являє собою -H або вибрана із будь-якої із наступних формул:





5

де:

q являє собою ціле число від 1 до 5; переважно q дорівнює 2;

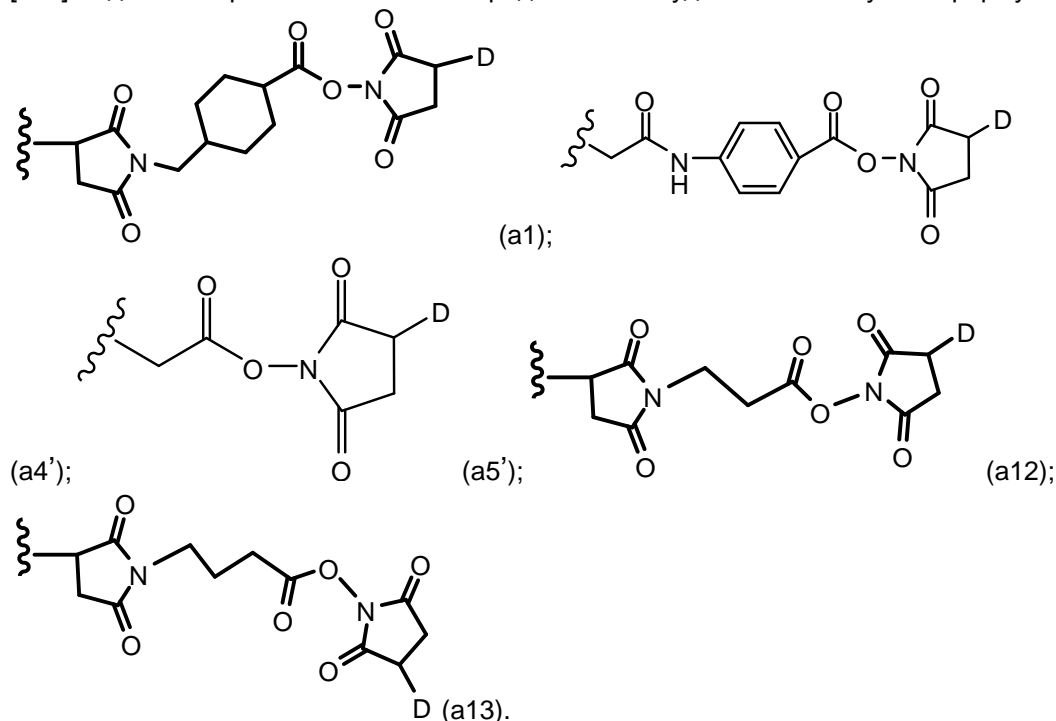
n являє собою ціле число від 2 до 6; переважно n дорівнює 4;

D являє собою -H або -SO<sub>3</sub>M;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

10

[167] У деяких варіантах втілення Z<sup>s</sup> представлена будь-якою з наступних формул:



15

[168] У деяких варіантах втілення, наприклад, у дев'ятому специфічному варіанті втілення, W' є -N(Re)-.

[169] У деяких варіантах втілення R<sup>e</sup> являє собою -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[170] У деяких варіантах втілення R<sup>k</sup> є -H або -Me, n дорівнює 4, а q дорівнює 2.

[171] У деяких варіантах втілення R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який

має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[172] У деяких варіантах втілення  $R^x$  являє собою  $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ , де кожна із  $R^f$  і  $R^g$  незалежно вибрана із -H або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а  $p$  дорівнює 0, 1, 2 або 3.

5 [173] У деяких варіантах втілення  $R^f$  і  $R^g$  є однаковими або різними і вибрані із -H і -Me; а  $p$  дорівнює 1.

[174] У десятому специфічному варіанті втілення змінні дев'ятого специфічного варіанту втілення наведені нижче: Y являє собою  $-SO_3M$ ; M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад,  $Na^+$ );  $X'$  і Y 'обидва є -H; A і A 'обидва являють собою -O-;  $R_6$  являє собою -OMe; а  $R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[175] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 9-й, Y вибрана із  $-SO_3M$ ,  $-SO_2M$  і сульфату  $-OSO_3M$ . Переважно Y являє собою  $-SO_3M$ , де M переважно являє собою -H,  $Na^+$  або  $K^+$ .

15 [176] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й, W, якщо присутня, являє собою  $C=O$ .

[177] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й, Z і Z', якщо присутні, являють собою  $-CH_2-$ .

[178] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й,  $X'$  вибрана із групи, яка складається з -H, -OH, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу, зв'язуючої групи із приєднаною до неї реакційноздатною групою та аміно-блокувальною групою. Переважно  $X'$  є -H, -OH, -Me або зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою. Більш переважно  $X'$  є -H.

25 [179] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й, Y' вибрана із групи, яка складається з -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Переважно Y' є -H або оксогрупою. Більш переважно Y' є -H.

[180] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й, A і A 'є однаковими або різними і вибрані з -O-, -S-,  $-NR_5$  і оксогрупи  $-(C=O)-$ . Переважно A і A 'є однаковими або різними і вибрані із -O- і -S-. Більш переважно A і A 'є -O-.

[181] У будь-якому з вищенаведених варіантів втілення, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 1-го по 10-й, D і D', якщо присутні, є однаковими або різними і, незалежно, вибрані з мономера поліетиленгліколю  $(-OCH_2CH_2)_n$ , де  $n$  є цілим числом від 1 до 24, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, або лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, де алкіл, алкеніл і алкініл, необов'язково, заміщені одним або більше заміників, незалежно вибраних із групи, яка складається з галогену, -OR,  $-NR^fCOR''$ , -SR і -COR'. Переважно D і D' являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю.

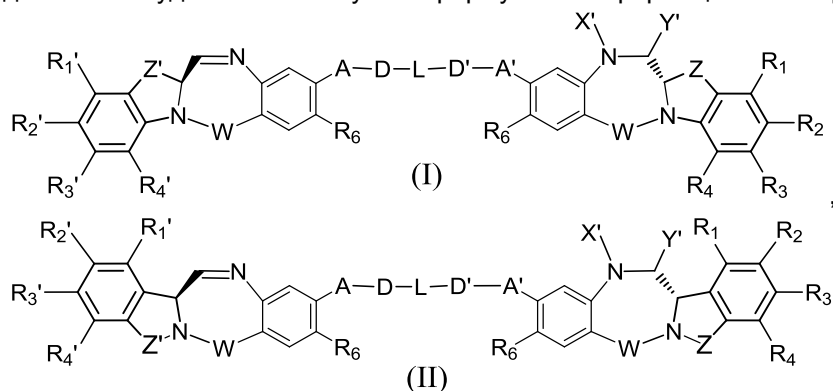
[182] В одинадцятому специфічному варіанті втілення різні групи цитотоксичних сполук першого, третього і дев'ятого специфічного варіанта втілення наведені нижче: W являє собою  $C=O$ ;  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_4$  і  $R_4'$  являють собою -H; одна із  $R_3$  або  $R_3'$ , необов'язково, являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, а інша являє собою -H;  $R_6$  являє собою -OMe; Z і Z 'є  $-CH_2-$ ;  $X'$  являє собою -H; Y 'являє собою -H; а A і A 'є -O-.

[183] В іншому варіанті втілення зв'язуюча група із приєднаною до неї реакційноздатною групою, як у будь-якому з вищенаведених специфічних варіантів втілення, є будь-якою із груп, перерахованих у списку 1.

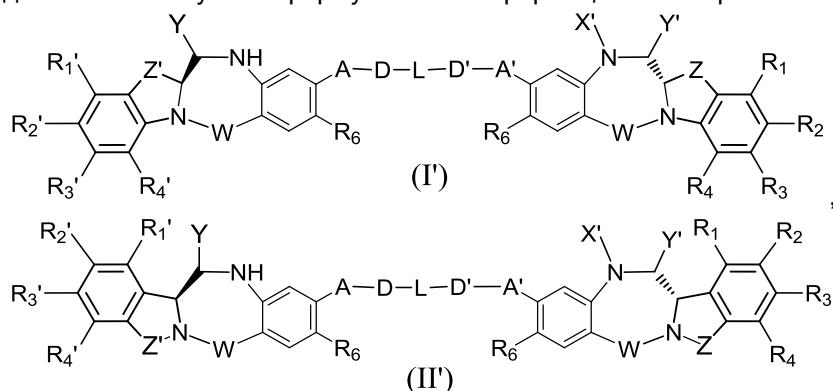
50 [184] У ще одному варіанті втілення цитотоксичні димери без лінкерних груп (наприклад, лінкерних груп, описаних вище), приєднаних до них, можуть додатково взаємодіяти з біфункціональним зшиваючим реагентом з утворенням лікарської речовини, яка несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою, призначеною для використання в способах згідно з даним винаходом (наприклад, з метою подальшої взаємодії з агентом, який зв'язується із клітинами, з утворенням кон'югату лікарська речовина/СВА). Альтернативно цитотоксичні димери без лінкерних груп (наприклад, лінкерних груп, описаних вище), приєднаних до них, можуть додатково взаємодіяти з біфункціональним зшиваючим реагентом і реагентом, який зв'язується із клітинами, в одноетапній реакції з метою безпосереднього утворення кон'югату лікарська речовина/СВА. У будь-якому разі реагент, здатний взаємодіяти з імінами, можна додавати до реакційної суміші з утворенням адукту лікарська речовина - реагент, здатний  
60 взаємодіяти з імінами (наприклад, адукту бісульфіту) перед реакцією утворення кон'югату

лікарська речовина/СВА. Переважно цитотоксичні димери без лінкерних груп (наприклад, лінкерних груп, описаних вище), приєднаних до них, можна спочатку попередньо інкубувати із реагентом, здатним взаємодіяти з імінамими, з утворенням адукту, до використання реакційної суміші в наступній реакції з утворенням кон'югату лікарська речовина/СВА.

- 5 [185] Так, у дванадцятому специфічному варіанті втілення імін-вмісна цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



- а після реакції з реагентом, здатним взаємодіяти з імінамими, цитотоксична сполука  
10 представлена наступною формулою або її фармацевтично прийнятною сіллю:



де:

- 15 Y являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_2^-$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфат ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_2$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородітіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^1)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^1$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероциклік або гетероарил; переважно Y являє собою адукт бісульфіту, гідросульфиту або метабісульфіту, або їх сіль (наприклад, сіль натрію);

- 30 X 'вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ , амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю (наприклад, фенілу), необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P. Переважно X' являє собою  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$  або  $-\text{Me}$ . Більш переважно X' являє собою  $-\text{H}$ ;

Y 'вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ , оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного,

розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів. Переважно  $Y'$  вибрана із -H або оксогрупи. Більш переважно  $Y'$  являє собою -H;

$R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

кожна із  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонамід, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR' і -OCONR'R''. Переважно 1, 2, 3 або всі із  $R_2, R_3, R_2'$  і  $R_3'$  є -H;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон;

R, в будь-якому випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

$R'$  і  $R''$  є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

$R_6$  являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, галоген, -OR<sup>c</sup> або -SR<sup>c</sup>; переважно  $R_6$  являє собою -OMe або -SMe. Ще більш переважно  $R_6$  являє собою -OMe;

Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ;

$n'$  і  $na'$  є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

$R_7$  і  $R_8$  є однаковими або різними і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

$R_9$ , незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-. Переважно A і A' є однаковими або різними і вибрані із -O- і -S-. Більш переважно A і A' є -O-;

$R_5$ , в будь-якому випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

L відсутня або, якщо присутня, включає тіолову групу і являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є, необов'язково, заміщеним.

[186] Типові структури таких імін-вмісних цитотоксичних сполук показано в Таблиці 15. Див.

сполуки 1, 3, 4, 5 і 1d.

[187] У деяких варіантах втілення

W являє собою C=O;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>' являють собою -H;

5 Z і Z' являють собою -CH<sub>2</sub>-;

A і AOB' ідва являють собою -O-;

W являє собою -(C=O)-;

G являє собою -CH-;

10 R<sub>6</sub> являє собою -H або, необов'язково, заміщений C1-C10 лінійний, C1-C10 розгалужений або C3-C7 циклічний алкіл, -O-алкіл або -O-гало-алкіл, наприклад, -OMe;

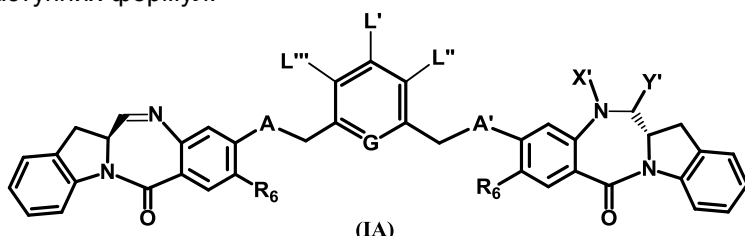
X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу і аміно-блокуючої групи; а

15 Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю.

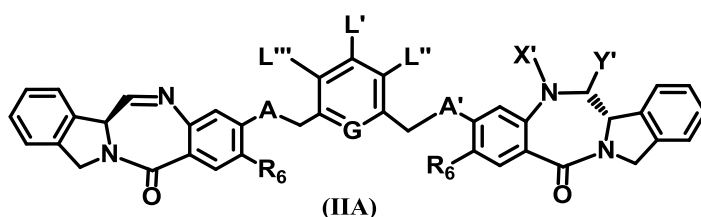
[188] Переважно Y вибрана із -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M або -OSO<sub>3</sub>M, де M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

[189] Переважно Y являє собою -SO<sub>3</sub>M; M являє собою -H або Na<sup>+</sup>.

20 [190] У деяких варіантах втілення імін-вмісна цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або



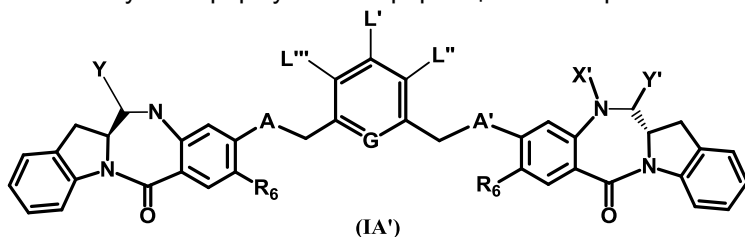
де:

25 L', L'' і L''' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, галогену, гуанідинію [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M, сульфату -OSO<sub>3</sub>M, сульфонаміду, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

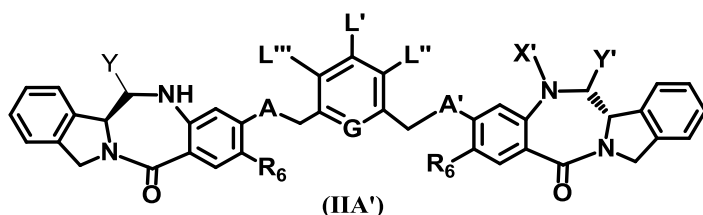
30 M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон; а

G вибрана із -CH- або -N-.

[191] У деяких варіантах втілення цитотоксична сполука, за її присутності, представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



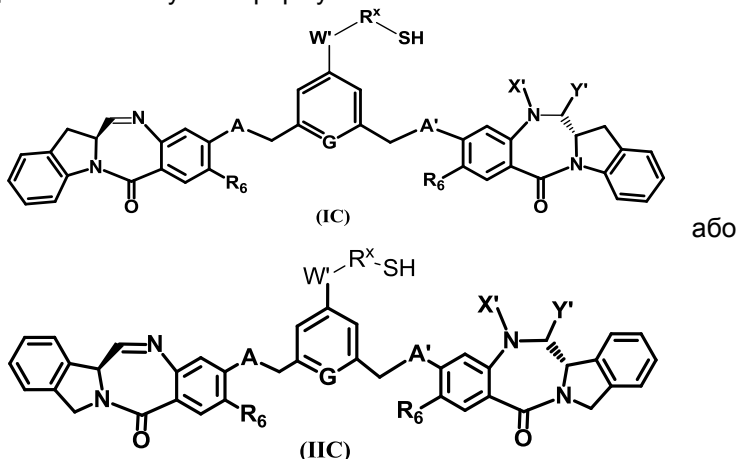
або



[192] У деяких варіантах втілення одна з L', L'' або L''' несе тіолову групу, а інші є -H. Переважно L' несе тіолову групу, а L'' і L''' є -H.

[193] У деяких варіантах втілення A і A' обидва є -O-; R<sub>6</sub> являє собою -OMe; а G являє собою -CH-.

[194] У деяких варіантах втілення імін-вмісна цитотоксична сполука може бути представлена будь-якою з наступних формул:



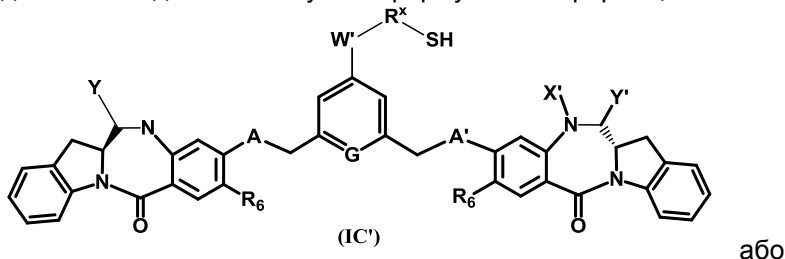
де:

W' відсутня або, за її присутності, вибрана із -CR<sup>e</sup>R<sup>e'</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -SS- або -C(=O)-, або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

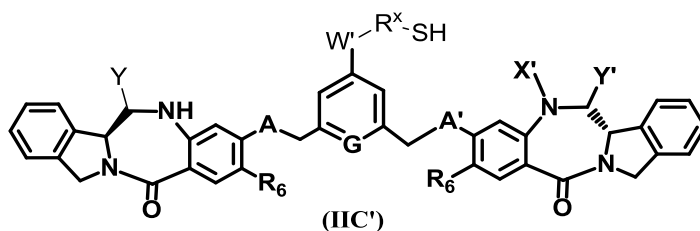
R<sup>x</sup> відсутня або, якщо присутня, являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

R<sup>e</sup> і R<sup>e'</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад, -NHR<sup>101</sup>) або третинну аміногрупу (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; n являє собою ціле число від 1 до 24.

[195] У деяких варіантах втілення цитотоксична сполука, за її присутності, може бути представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:







[196] У деяких варіантах втілення

Y вибрана із  $-\text{SO}_3\text{M}$ ,  $-\text{SO}_2\text{M}$  або  $-\text{OSO}_3\text{M}$ ;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад,  $\text{Na}^+$  або  $\text{K}^+$ ;

5 X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу і аміно-блокуючої групи;

Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

A і A' вибрані із -O- і -S-;

W' відсутня або вибрана із -O-,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ , -S- або  $-\text{CH}_2\text{-S-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ;

15 R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sup>e</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-\text{NHR}^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

G вибрана із -CH- або -N-.

[197] У деяких варіантах втілення W' є  $-\text{N}(\text{Re})-$ .

25 [198] У деяких варіантах втілення R<sup>e</sup> являє собою  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[199] У деяких варіантах втілення R<sup>k</sup> є -H або -Me, n дорівнює 4, а q дорівнює 2.

[200] У деяких варіантах втілення R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

30 [201] У деяких варіантах втілення R<sup>x</sup> являє собою  $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CR}^f\text{R}^g)-$ , де кожна із R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup>, незалежно, вибрана із -H або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а p дорівнює 0, 1, 2 або 3.

[202] У деяких варіантах втілення R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H і -Me; а p дорівнює 1.

35 [203] У деяких варіантах втілення

Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ,  $-\text{SO}_2\text{M}$  або сульфат  $-\text{OSO}_3\text{M}$ ; переважно  $-\text{SO}_3\text{M}$ ;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад,  $\text{Na}^+$ );

X' і Y' обидва являють собою -H;

A і A' обидва являють собою -O-;

40 R<sub>6</sub> являє собою -OMe; а

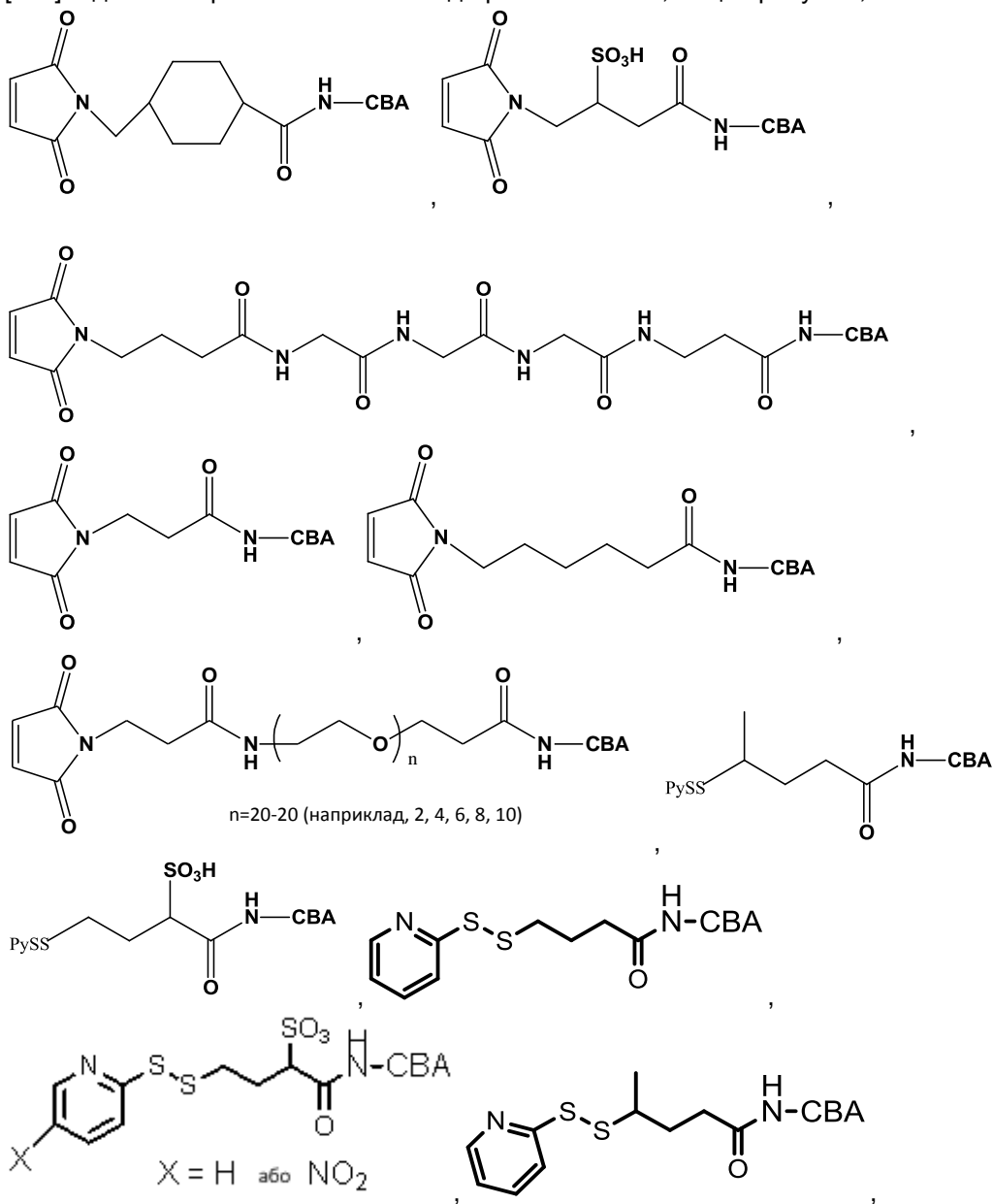
R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

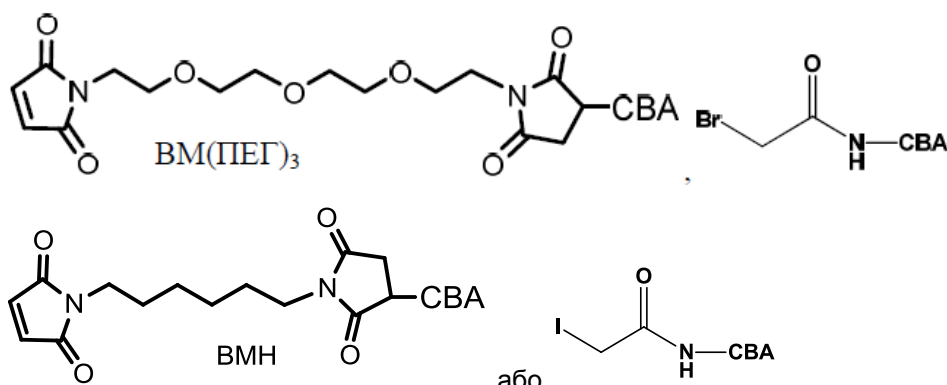
[204] У деяких варіантах втілення біфункціональний зшиваючий агент являє собою: групу на основі малеїміду, вибрану із: N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилату (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроату) (LC-SMCC), N-сукцинімідилового ефіру κ-малеїмідундеканової кислоти (KMUA), N-сукцинімідилового ефіру γ-малеїмідмасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідного ефіру ε-малеїмідокaproнової кислоти (EMCS), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідного ефіру (MBS), N-(α-малеїмідоацетокси)-сукцинімідного ефіру (AMAS), сукцинімідил-6-(β-малеїмідопропіонамідо)гексаноату (SMPH), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутирату (SMPB), N-(п-малеїмідифеніл)ізоціанату (PMPI), N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату; або групу на основі галоацетила, вибрану із: N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоату (SIAB), N-сукцинімідилйодоацетату (SIA), N-сукцинімідилбромоацетату (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромоацетамідо)пропіонату (SBAP), біс-малеїмідополіетиленгліколю (BMPEO),

BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-(β-малеїмідпропілокси)сукцинімідного ефіру (BMPS), NHS 5-малеїмідовалеріанової кислоти, HBVS, гідразиду•HCl 4-(4-N-малеїмідфеніл)-масляної кислоти (MPBH), сукцинімідил-(4-вінілсульфоніл)бензоату (SVSB), дитіобіс-малеїмідоетану (DTME), 1,4-біс-малеїмідобутану (BMB), 1,4-біс-малеїмідил-2,3-дигідроксибутану (BMDB), біс-малеїмідогексану (BMH), біс-малеїмідоетану (BMOE), сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідо-метил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC), сульфосукцинімідил(4-йодо-ацетил)амінобензоату (сульфо-SIAB), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру (сульфо-MBS), N-(γ-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-GMBS), N-(ε-малеїмідокапроїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-EMCS), N-(κ-малеїмідоундеканоїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-KMUS), сульфосукцинімідил-4-(п-малеїмідофеніл)бутирату (сульфо-SMPB), CX1-1, сульфо-Mal і ПЕГ<sub>n</sub>-Mal.

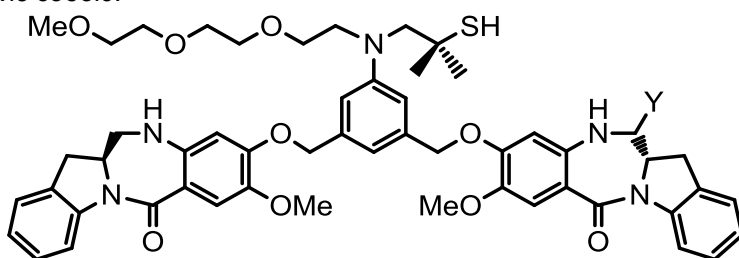
[205] У деяких варіантах втілення біфункціональний зшиваючий агент вибраний із групи, яка складається з SMCC, сульфо-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, біс-малеїмідогексану або BMPEO.

[206] У деяких варіантах втілення модифікований СВА, якщо присутній, являє собою:





[207] У тринадцятому специфічному варіанті втілення імін-вмісна цитотоксична сполука являє собою:



[208] Біфункціональні агенти, які зшивають, можуть бути будь-якими біфункціональними лінкерами, відомими в даній галузі техніки. Наприклад, біфункціональні лінкери, які можна використовувати для виготовлення сполук лікарська речовина-лінкер, є лінкерами, які утворюють дисульфідні зв'язки, прості тіоефірні зв'язки, кислотнолабільні зв'язки, фотолабільні зв'язки, пептидазо-лабільні зв'язки і естеразо-лабільні зв'язки із цитотоксичними сполуками (див. наприклад, патенти США 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 і 7414073, включені в даний документ за допомогою посилання). Переважно біфункціональні агенти, які зшивають, є агентами, які утворюють дисульфідні зв'язки, прості тіоефірні зв'язки і пептидазо-лабільні зв'язки із цитотоксичними сполуками. Інші біфункціональні зшиваючі агенти, які можна використовувати у даному винаході, включають нерозщеплювані лінкери, наприклад, лінкери, описані в публікації патенту США № 2005/0169933, або заряджені лінкери, або гідрофільні лінкери, і описані в US 2009/0274713, US 2010/01293140 і WO 2009/134976, кожен із яких спеціально включений в даний документ за допомогою посилання. Біфункціональні агенти, які зшивають, які можна використовувати для виготовлення сполук лікарська речовина-лінкер згідно з даним винаходом, також включають сполуки, описані в Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook, зміст якої повністю включений в даний документ за допомогою посилання.

[209] У ще одному кращому варіанті лікарська речовина (з або без лінкерної групи із приєднаною до неї реакційноздатною групою), яку можна використовувати в даному винаході, є будь-якою зі сполук, показаних у Таблицях 1-7. У ще одному кращому варіанті втілення кон'югат агент, який зв'язується із клітинами/лікарська речовина, який можна виготовити згідно із даним винаходом, є будь-яким із кон'югатів, показаних у Таблиці 8.

Таблиця 1

Структури типових сполук згідно з даним винаходом.


Примітки:

n = 1 або 3

m = 3 або 4

W = OH, OMe, ONHS, NHNH<sub>2</sub>, H, Me, Ph, пептидX = CH<sub>2</sub>, O, S, NH або NMeY = CH<sub>2</sub> або відсутняZ'' = H, Me, SMe, S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NHS або CH<sub>2</sub>C(O)NHS, або BMPS, або SMCC, або SPy, або SPy-NO<sub>2</sub>

Таблиця 2

Структури типових сполук згідно з даним винаходом (продовження).


Примітка:

n = 1, 2 або 3

m = 3 або 4

W = OH, OMe, ONHS, NHNH<sub>2</sub>, H, Me, Ph, пептид

X = CH<sub>2</sub>, O, S, NH, NMe

Y = відсутня або CH<sub>2</sub>

Z = CH або N

Z'' = H, Me, SMe, S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NHS або CH<sub>2</sub>C(O)NHS, або BMPS, або SMCC, або Spy, або SPy-NO<sub>2</sub>

Таблиця 3

Структури типових сполук згідно з даним винаходом (продовження)


Примітка:

n = 1, 2 або 3

m = 3 або 4

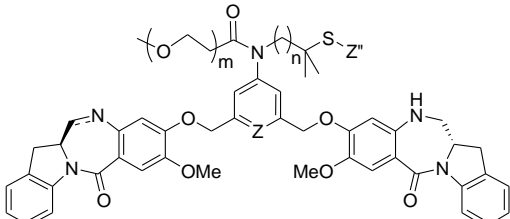
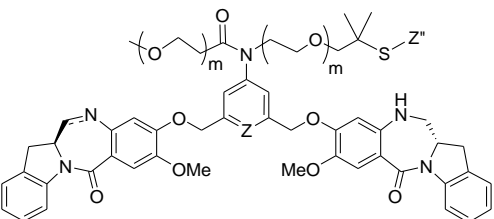
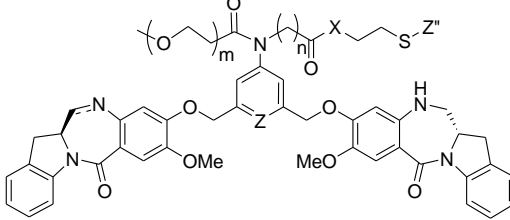
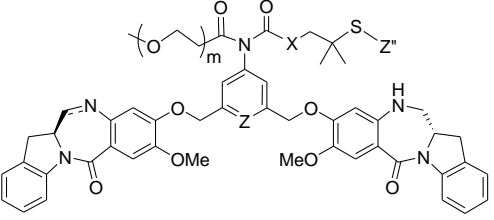
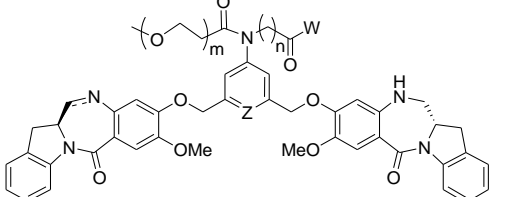
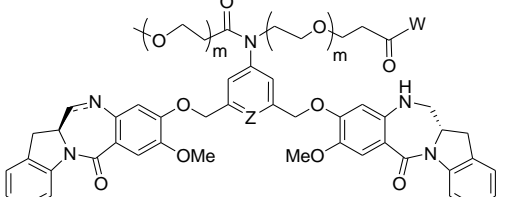
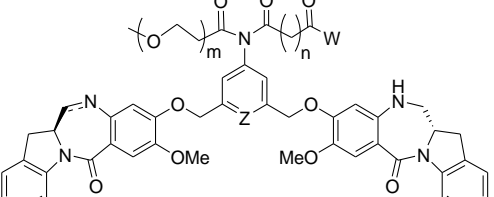
W = OH, OMe, ONHS, NHNH<sub>2</sub>, H, Me, Ph, пептидX = CH<sub>2</sub>, O, S, NH, NMe

Z = CH або N

Z'' = H, Me, SMe, S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NHS або CH<sub>2</sub>C(O)NHS, або BMPS, або SMCC, або SPy, або SPy-NO<sub>2</sub>

Таблиця 4

Структури типових сполук згідно з даним винаходом (продовження).

Примітка:

 $n = 1, 2$  або  $3$ 
 $m = 3$  або  $4$ 
 $W = \text{OH}, \text{OMe}, \text{ONHS}, \text{NHNH}_2, \text{H}, \text{Me}, \text{Ph}, \text{пептид}$ 
 $X = \text{CH}_2, \text{O}, \text{S}, \text{NH}, \text{NMe}$ 
 $Z = \text{CH}$  або  $\text{N}$ 
 $Z'' = \text{H}, \text{Me}, \text{SMe}, \text{S}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NHS}$  або  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHS}$ , або  $\text{BMPS}$ , або  $\text{SMCC}$ , або  $\text{SPy}$ , або  $\text{SPy-NO}_2$

## Структури типових сполук згідно з даним винаходом

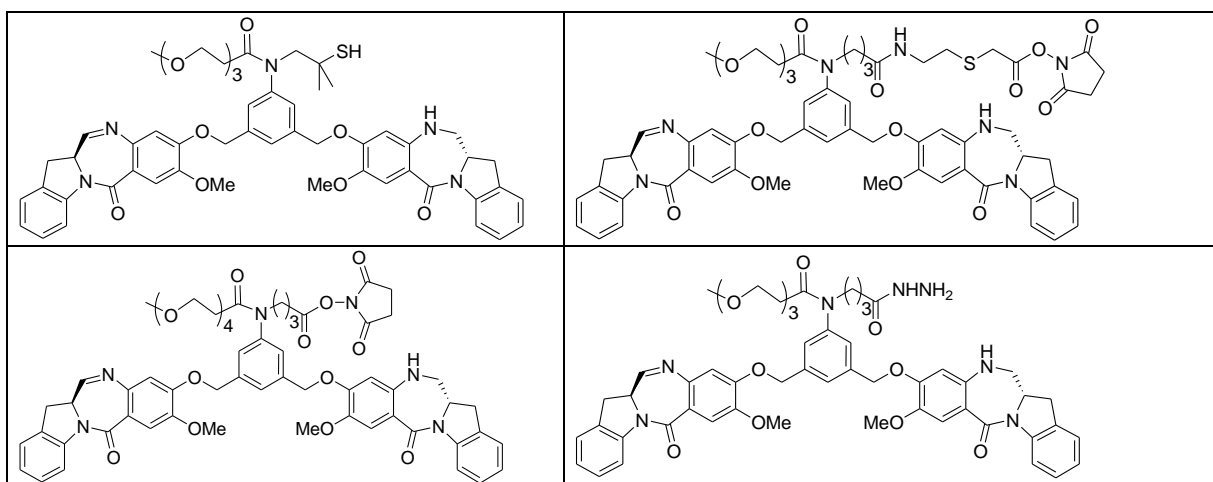



Таблиця 6

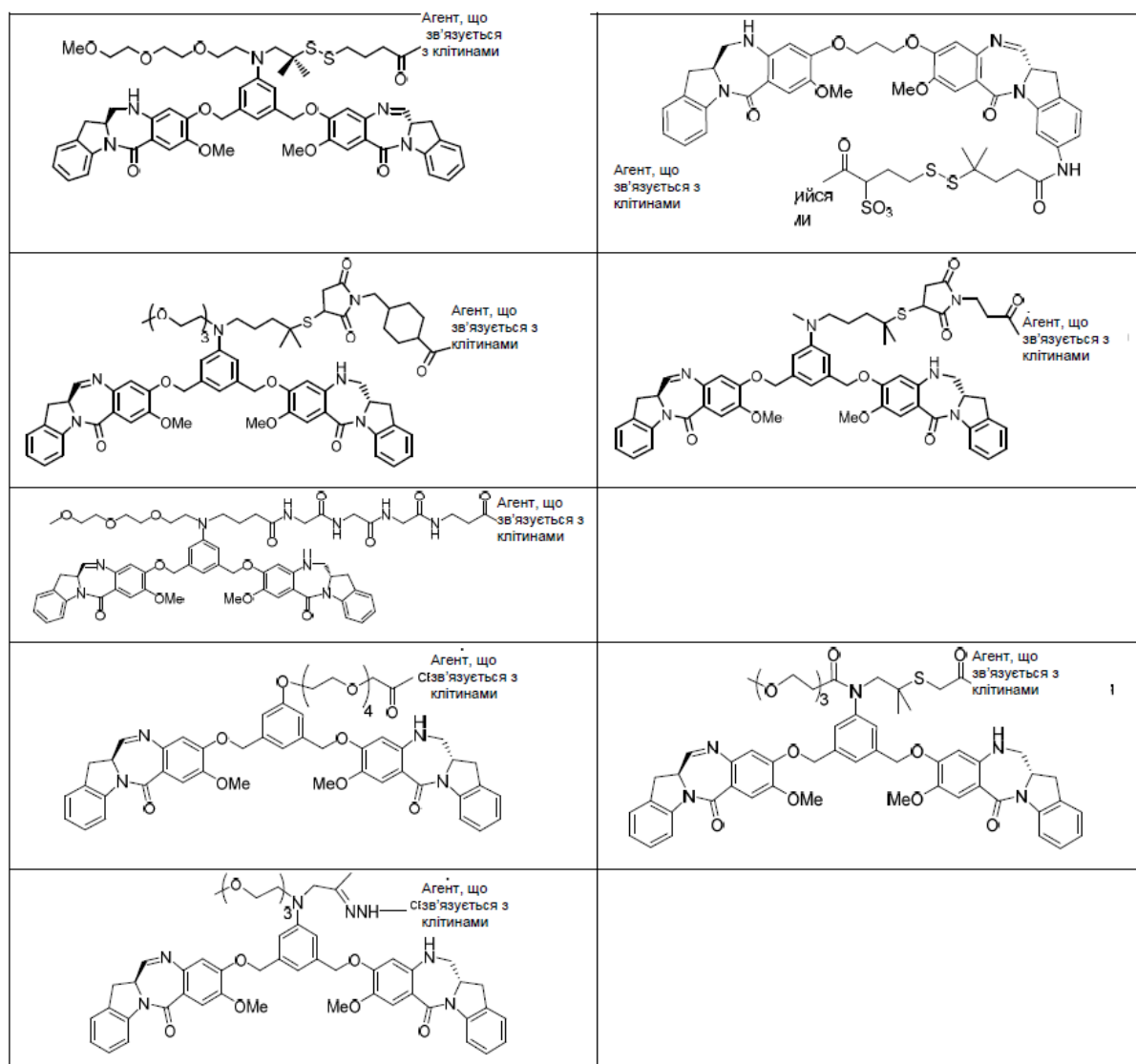
Структури типових сполук згідно з даним винаходом (продовження)


Таблиця 7

Структури типових сполук згідно з даним винаходом (продовження)



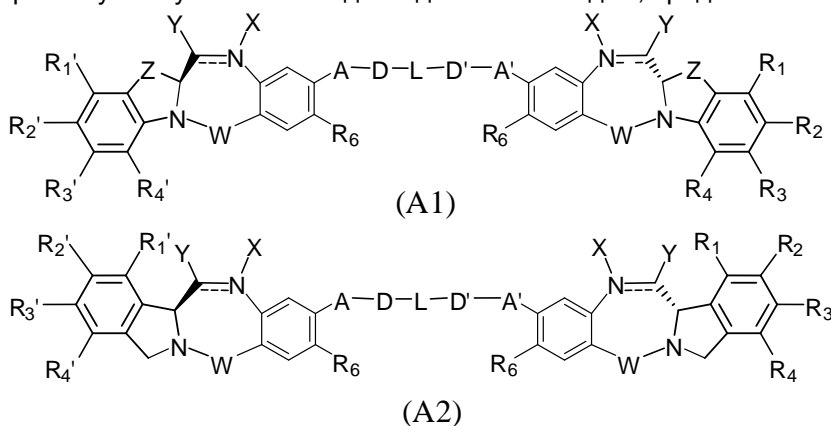
Таблиця 8. Структури типових кон'югатів згідно з даним винаходом



[210] У будь-якій зі сполук або кон'югатів, описаних вище в Таблицях 1-8, подвійний імінний зв'язок може взаємодіяти/прореагувати з будь-яким з реагентів, здатних взаємодіяти з імінами (наприклад, реагентами, описаними тут), у відповідності зі способами згідно з винаходом, з утворенням адуктів, у тому числі адуктів бісульфіту. Такі імін-блоковані адукти у сполуках з

Таблиць 1-7 можна використовувати в подальших реакціях, у відповідності зі способами згідно з даним винаходом, з метою одержання кон'югатів згідно з винаходом. Аналогічно сполуки, які містять імін-блоковані адукти, можна використовувати в способах згідно з даним винаходом для одержання кон'югатів з Таблиці 8.

[211] У ще одному варіанті втілення лікарські речовини, які необов'язково містять зв'язуючу групу (наприклад, лінкерну групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою), які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом, представлені формулою (A1) або (A2):



де:

подвійна лінія == між N і C являє собою одинарний зв'язок або подвійний зв'язок, за умови, що щонайменше одна із == між N і C являє собою подвійний зв'язок, і, коли вона являє собою подвійний зв'язок, X відсутня, а Y являє собою -H, а коли вона являє собою одинарний зв'язок, X являє собою -H або аміно-блокуючу групу, яка перетворює сполуку на проліки; у переважному випадку, коли вона являє собою подвійний зв'язок, X відсутня, Y являє собою -H, а подвійний зв'язок може взаємодіяти з реагентом згідно з винаходом, здатним взаємодіяти з імінами, з утворенням адукту (наприклад, адукту бісульфіту), перед використанням адукту в способах згідно з винаходом з метою отримання кон'югатів лікарська речовина/CBA;

Y вибрана із -H, -OR, складного ефіру, представленого -OCOR', карбонату, представленого -OCOOR', карбамату, представленого -OCONR'R'', аміну або гідроксиаміну, представленого -NR'R'', аміді, представленого -NRCOR', пептиду, представленого -NRCOP, де P являє собою амінокислоту або поліпептид, який містить від 2 до 20 амінокислот, тіоефір, представлений -SR', сульфоксид, представлений -SOR', сульфон, представлений -SO<sub>2</sub>R', сульфат -SO<sub>3</sub>, бісульфіт -OSO<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, галоген, ціаногрупу, азидогрупу або тіол; де M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад, Na<sup>+</sup>); або

Y являє собою сульфат (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> або сіль HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> або HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном), метабісульфіт (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>3</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, PO<sub>3</sub>S<sub>3</sub>H, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> або сіль PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, PO<sub>3</sub>S<sub>3</sub><sup>3-</sup> або PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>, утворену катіоном), складний ефір тіофосфату (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>, тіосульфат (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), дитіоніт (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> або сіль S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, утворену катіоном), фосфородітіоат (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту (R<sup>k</sup>C(=O)NOH або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксидат (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> або сіль HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утворену катіоном, наприклад, HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) або їх суміш, де R<sup>i</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup>, необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут; R<sup>j</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил;

R, R' і R'' є однаковими або різними і вибрані із -H, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономер поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20), 5- або 6-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, 5-18-членної системи

конденсованих кілець, де щонайменше одне із кілець являє собою ароматичне, яка містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із O, S, N і P, де замітник вибраний із галогену, -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфїту -SO<sub>3</sub>, бісульфїту -OSO<sub>3</sub>, сульфонамїду, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, -OCOR<sub>11</sub> або -CONR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>;

кожна із R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> і R<sub>12</sub>, незалежно, вибрана із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20), 5- або 6-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, 5-18-членної системи конденсованих кілець, де щонайменше одне із кілець являє собою ароматичне, яка містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, 3-10-членного гетероциклічного кільця, яке має 3-18-членне гетероциклічне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із O, S, N і P, а R<sub>10</sub>, необов'язково, являє собою SR<sub>13</sub> або COR<sub>13</sub>;

R<sub>13</sub> вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, 5- або 6-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, 5-18-членної системи конденсованих кілець, де щонайменше одне із кілець являє собою ароматичне, яка містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із O, S, N і P, R<sub>11</sub>, необов'язково, являє собою OR<sub>14</sub>, де R<sub>14</sub> має те ж значення, що й R, R'', необов'язково, являє собою -OH;

W являє собою C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із -H, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20), або замітника, вибраного із галогену, гуанїдинїю [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфїту -SO<sub>3</sub>, бісульфїту -OSO<sub>3</sub>, сульфонамїду, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, -OCOR<sub>11</sub> або -CONR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>, де R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> і R<sub>12</sub> такі, як визначено вище, необов'язково, кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' або R<sub>4</sub>' являє собою лінкерну групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), яку можна вибрати із мономера поліпіроло, полііндолїлу, поліїмідазолїлу, поліпіролоїмідазолїлу, поліпіролоїндолїлу або поліїмідазолоїндолїлу, який необов'язково несе лінкерну групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;

Z вибрана із -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n дорівнює 1, 2 або 3, -CR<sub>15</sub>R<sub>16</sub>, -NR<sub>17</sub>, -O- або -S-, де кожна із R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub> і R<sub>17</sub>, незалежно, вибрана із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20);

R<sub>6</sub> являє собою -OR, -SR або -NRR', де R і R' відповідають вищенаведеним визначенням, необов'язково, R<sub>6</sub> являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності);

X' вибраний із -CH<sub>2</sub>, -NR, -CO, -BH, -SO або -SO<sub>2</sub>, де R відповідає вищенаведеному визначенню;

Y' являє собою -O-, -CH<sub>2</sub>-, -NR або -S, де R відповідає вищенаведеному визначенню;

Z' являє собою -CH<sub>2</sub> або -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n дорівнює 2, 3 або 4, за умови, що не всі із X', Y' і Z' є CH<sub>2</sub> одночасно;

A і A' є однаковими або різними і вибрані із -O-, -CRR'O, S, -CRR'S, -NR<sub>15</sub> або -CRR'NHR<sub>15</sub>, де R і R' відповідають вищенаведеним визначенням і де R<sub>15</sub> має те ж значення, що й R;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного будь-яким із галогену, -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфїту -SO<sub>3</sub>, бісульфїту -OSO<sub>3</sub>, сульфонамїду, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, -OCOR<sub>11</sub> або -

ОСОНR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>, де визначення R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> і R<sub>12</sub> відповідають вищевизначеним, або мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20);

5 L являє собою необов'язкову фенільну групу або 3-18-членне гетероциклічне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із O, S, N і P, необов'язково заміщений, причому замітник являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності) або вибраний із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного будь-яким із галогену, -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R',  
10 сульфату -SO<sub>3</sub>, бісульфату -OSO<sub>3</sub>, сульфонамідів, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, OCOR<sub>11</sub> або ОСОНR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>, де R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> і R<sub>12</sub> відповідають вищевизначеним визначенням, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20); необов'язково, L сама по собі являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою; або її фармацевтично прийнятні  
15 сольвати, солі, гідрати або гідратовані солі, їх оптичні ізомери, рацемати, диастереомери, енантіомери або поліморфні кристалічні структури вказаних сполук; за умови, що вказана сполука містить не більше однієї зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою.

[212] В одному кращому варіанті втілення для лікарських речовин формули (A1) і (A2):

20 подвійна лінія == між N і C являє собою одинарний зв'язок або подвійний зв'язок, за умови, що, коли вона являє собою подвійний зв'язок, X відсутня, а Y являє собою -H, а коли вона являє собою одинарний зв'язок, X являє собою -H або аміно-блокуючу групу, яка перетворює сполуку на проліки;

25 Y вибрана із -H, -OR, NR'R", сульфату -SO<sub>3</sub>M або бісульфату -OSO<sub>3</sub>M, де M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад, Na<sup>+</sup>);

R вибрана із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20), арилу, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, гетероциклічного кільця, яке має від 3 до 10 атомів вуглецю;

30 W являє собою C=O, CH<sub>2</sub> або SO<sub>2</sub>;

кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із -H, -NO<sub>2</sub> або зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності);

R<sub>6</sub> являє собою -OR<sub>18</sub>, де R<sub>18</sub> відповідає визначенню для R;

35 Z вибрана із -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n дорівнює 1, 2 або 3, -CR<sub>15</sub>R<sub>16</sub>, -NR<sub>17</sub>, -O- або -S-, де кожна із R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub> і R<sub>17</sub>, незалежно, вибрана із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20);

X' вибрана із -CH<sub>2</sub> або C=O;

Y' являє собою -O-, -NR або -S, де R відповідає вищевизначеному визначенню;

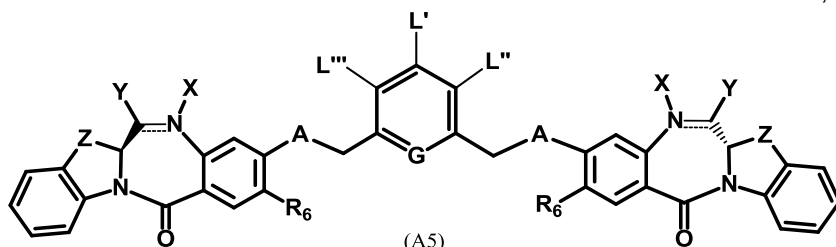
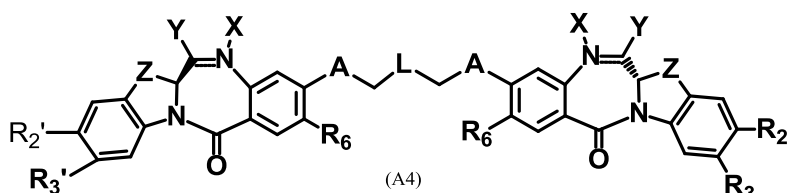
40 Z' являє собою -CH<sub>2</sub>- або -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-;

кожна із A і A' являє собою -O-;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

45 L являє собою необов'язкову фенільну групу або гетероциклічне кільце, яке має від 3 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщений, причому замітник являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності) або вибраний із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного будь-яким із галогену, -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфату -SO<sub>3</sub>, бісульфату -OSO<sub>3</sub>, сульфонамідів, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, -OCOR<sub>11</sub> або -ОСОНR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>, мономера поліетиленгліколю (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, де n являє собою ціле число від 1 до 2000 (переважно 1-200 або 1-20); необов'язково, L сама по собі являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою; або її фармацевтично прийнятні  
50 сольвати, солі, гідрати або гідратовані солі, їх оптичні ізомери, рацемати, диастереомери, енантіомери або поліморфні кристалічні структури вказаних сполук.  
55

[213] У ще одному кращому варіанті втілення лікарська речовина формули (A1) або (A2) представлена сполуками формул (A4) або (A5):



де:

подвійна лінія  $\equiv$  між N і C являє собою одинарний зв'язок або подвійний зв'язок, за умови, що, коли вона являє собою подвійний зв'язок, X відсутня, а Y являє собою -H, а коли вона являє собою одинарний зв'язок, X являє собою -H або аміно-блокуючу групу, яка перетворює сполуку на проліки;

Y вибрана із -H, -OH, ефіру, представленого -OR, -NR'R'', сульфату -SO<sub>3</sub>M або бісульфату -OSO<sub>3</sub>M;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад, Na<sup>+</sup>);

R, R' і R'' вибрані із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

одна із R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' і R<sub>3</sub>' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), а інші є -H, -NRCOR' або -NO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -OR, де R відповідає вищенаведеному визначенню;

Z являє собою -CH<sub>2</sub>- або -NR, де R відповідає вищенаведеному визначенню;

A являє собою -O- або -NR<sub>15</sub>;

L являє собою -(CH<sub>2</sub>)<sub>nn</sub>-, де nn являє собою 0 або ціле число від 1 до 5, або заміщений або незаміщений алкіл або алкеніл, який має від 2 до 4 атомів вуглецю, причому замітник вибраний із галогену, -OR<sub>7</sub>, -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NRCOR', -SR<sub>10</sub>, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфату -SO<sub>3</sub>, бісульфату -OSO<sub>3</sub>, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NRR', ціаногрупи, азидогрупи, -COR<sub>11</sub>, -OCOR<sub>11</sub> або -OCONR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>;

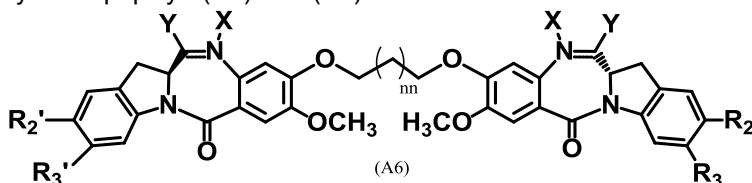
R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub> і R<sub>15</sub> відповідають вищенаведеному визначенню;

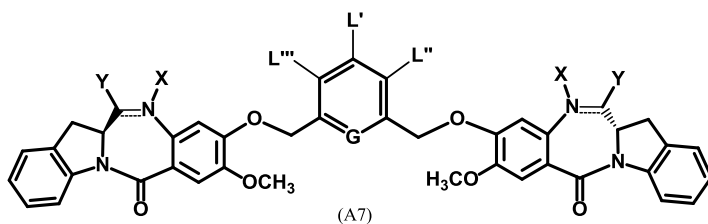
необов'язково, L сама по собі являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності);

одна із L', L'' або L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), в той час як інші є -H; переважно L' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності); а

G являє собою -CH- або -N-, або їх фармацевтично прийнятні сольвати, солі, гідрати або гідратовані солі, їх оптичні ізомери, рацемати, диастереомери, енантіомери або поліморфні кристалічні структури вказаних сполук.

[214] У ще одному кращому варіанті втілення сполука формули (A1) або (A2) представлена сполуками формул (A6) або (A7):





де:

подвійна лінія  $\equiv$  між N і C являє собою одинарний зв'язок або подвійний зв'язок, за умови, що, коли вона являє собою подвійний зв'язок, X відсутня, а Y являє собою -H, а коли вона являє собою одинарний зв'язок, X являє собою -H або аміно-блокуючу групу, яка перетворює сполуку на проліки;

Y вибрана із -H, -OH, ефіру, представленого -OR, сульфату -SO<sub>3</sub> або бісульфату -OSO<sub>3</sub>;

R вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

nn дорівнює 0 або ціле число від 1 до 5;

одна із R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' і R<sub>3</sub>' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), а інші є -H, -NRCOR' або -NO<sub>2</sub>;

одна із L', L'' або L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), за умови, що, якщо одна із L', L'' або L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, інші є -H (наприклад; якщо L' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, то L'' і L''' є -H);

G являє собою -CH- або -N-, або їх фармацевтично прийнятні сольвати, солі, гідрати або гідратовані солі, їх оптичні ізомери, рацемати, диастереомери, енантіомери або поліморфні кристалічні структури вказаних сполук.

[215] В іншому специфічному варіанті втілення одна з R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' і R<sub>3</sub>' формул (A4) і (A6) є зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою (якщо присутня) і представлена формулою -W'-R<sup>x</sup>-V-R<sup>y</sup>-J, а інші є -H; L'' і L''' формул (A5) і (A7) є -H, а L' є зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності) і представлена формулою

-W'-R<sup>x</sup>-V-R<sup>y</sup>-J,

де:

W' відсутня, являє собою -CR<sup>c</sup>R<sup>e</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -S-, -CH<sub>2</sub>-S-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O- або -C(=O)-;

R<sup>x</sup> відсутня або являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

V відсутня, являє собою -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-, -O-, -O-C(=O)-, -S-, -O-(C=O)O-, O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -C(=O)-, амінокислоту або пептид, який має від 2 до 8 амінокислот;

R<sup>y</sup> відсутня або являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sup>c</sup> являє собою -H або лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

R<sup>e</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,

n являє собою ціле число від 1 до 24; а

J відповідає опису, наведеному вище в четвертому специфічному варіанті втілення.

[216] Переважно R<sup>c</sup> являє собою -H або -Me; R<sup>e</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, n являє собою ціле число від 2 до 8, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище в четвертому специфічному варіанті втілення.

[217] У ще одному кращому варіанті втілення V являє собою амінокислоту або пептид, який має від 2 до 8 амінокислот. Більш переважно V є валін-цитруліном, gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu.

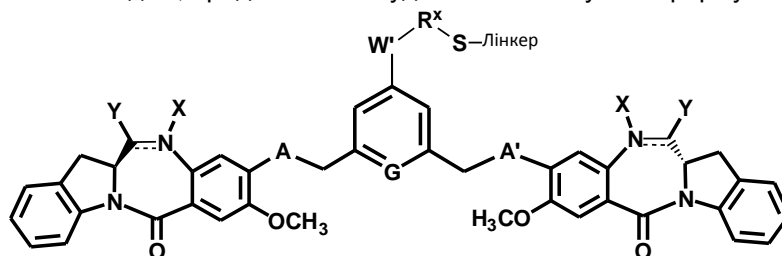
[218] Переважно J є -SH, -SSR<sup>d</sup> або -COE, як описано вище.

[219] У ще одному специфічному варіанті втілення одна з R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' і R<sub>3</sub>' формули (A4) і (A6) є зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою (за її присутності), і представлена формулою -W'-R<sup>x</sup>-S-Z<sup>s</sup>; L'' і L''' формул (A5) і (A7) є -H, а L' представлена -W'-R<sup>x</sup>-S-Z<sup>s</sup>, де змінні відповідають опису, наведеному у восьмому і дев'ятому специфічних варіантах втілення.

[220] В іншому варіанті втілення сполуки формули (A1)-(A7) (з або без попереднього інкубування з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами), якщо зв'язуюча група із приєднаною до неї реакційноздатною групою вже відсутня, може далі взаємодіяти з біфункціональним зшиваючим реагентом, описаним вище, з утворенням імін-вмісної лікарської речовини, яка несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою, яку можна використовувати у

способах згідно з даним винаходом.

[221] У деяких варіантах втілення імін-вмісна лікарська речовина, яка несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою, яку можна використовувати у способах згідно з даним винаходом, представлена будь-якою з наступних формул:



(A8)

де:

"Лінкер" представлений формулою (a1), (a2), (a3), (a4), (a5), (a6), (a7) або (a8), описаною вище (у дев'ятому специфічному варіанті втілення);

q являє собою ціле число від 1 до 5;

n являє собою ціле число від 2 до 6;

D являє собою -H або -SO<sub>3</sub>M;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>; а інші змінні відповідають опису у восьмому або дев'ятому специфічних варіантах втілення.

[222] Переважно q дорівнює 2, а n дорівнює 4.

[223] У кращому варіанті втілення лінкер представлений формулою (a1), (a4), (a5), (a9) або (a10), описаною вище.

[224] У деяких варіантах втілення для сполук формули (A8), описаних безпосередньо вище, змінні відповідають опису, наведеному нижче:

W' являє собою -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(COR<sup>e</sup>)-, -S- або -CH<sub>2</sub>-S-;

R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

R<sup>e</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе первинну, вторинну або третинну аміногрупу, або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін;

n являє собою ціле число від 1 до 24, а інші змінні відповідають опису, наведеному у варіанті втілення безпосередньо вище.

[225] Переважно R<sup>k</sup> є -H або -Me, а n є цілим числом від 2 до 8. Переважно R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[226] У ще одному кращому варіанті втілення лінкер представлений будь-якою формулою, вибраною з формул (a1), (a4), (a5), (a10) і (a11), показаних вище, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище в дев'ятому специфічному варіанті втілення.

[227] У деяких варіантах втілення для сполук формули (A8), описаних вище у варіантах втілення, змінні відповідають опису, наведеному нижче:

X' і Y' обидва являють собою -H;

A і A' обидва являють собою -O-;

R<sub>6</sub> являє собою -OMe;

R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище.

[228] Переважно R<sup>x</sup> являє собою -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, де кожна із R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup>, незалежно, вибрана із -H або лінійного, або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; p дорівнює 0, 1, 2 або 3. Більш переважно R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H і -Me, а p дорівнює 1.

[229] У ще одному кращому варіанті втілення лінкер представлений будь-якою формулою, вибраною з формул (a1), (a4), (a5), (a10) і (a11), показаних вище, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище.

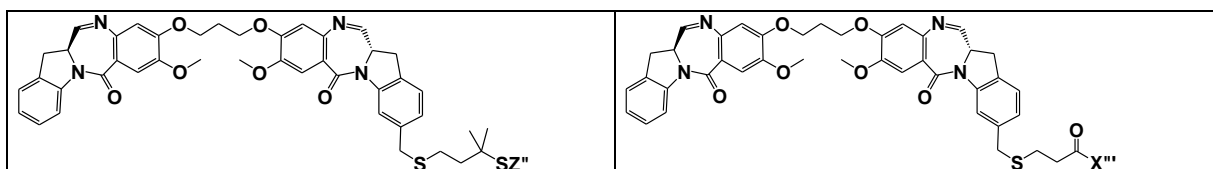


[230] У ще одному кращому варіанті втілення лікарська речовина формули (A1), (A2) або (A3) є будь-якою зі сполук, показаних у Таблицях 11-13, а кон'югат, який можна виготовити згідно зі способом відповідно до даного винаходу, є будь-яким з кон'югатів, показаних у Таблиці 14.

5

Таблиця 11

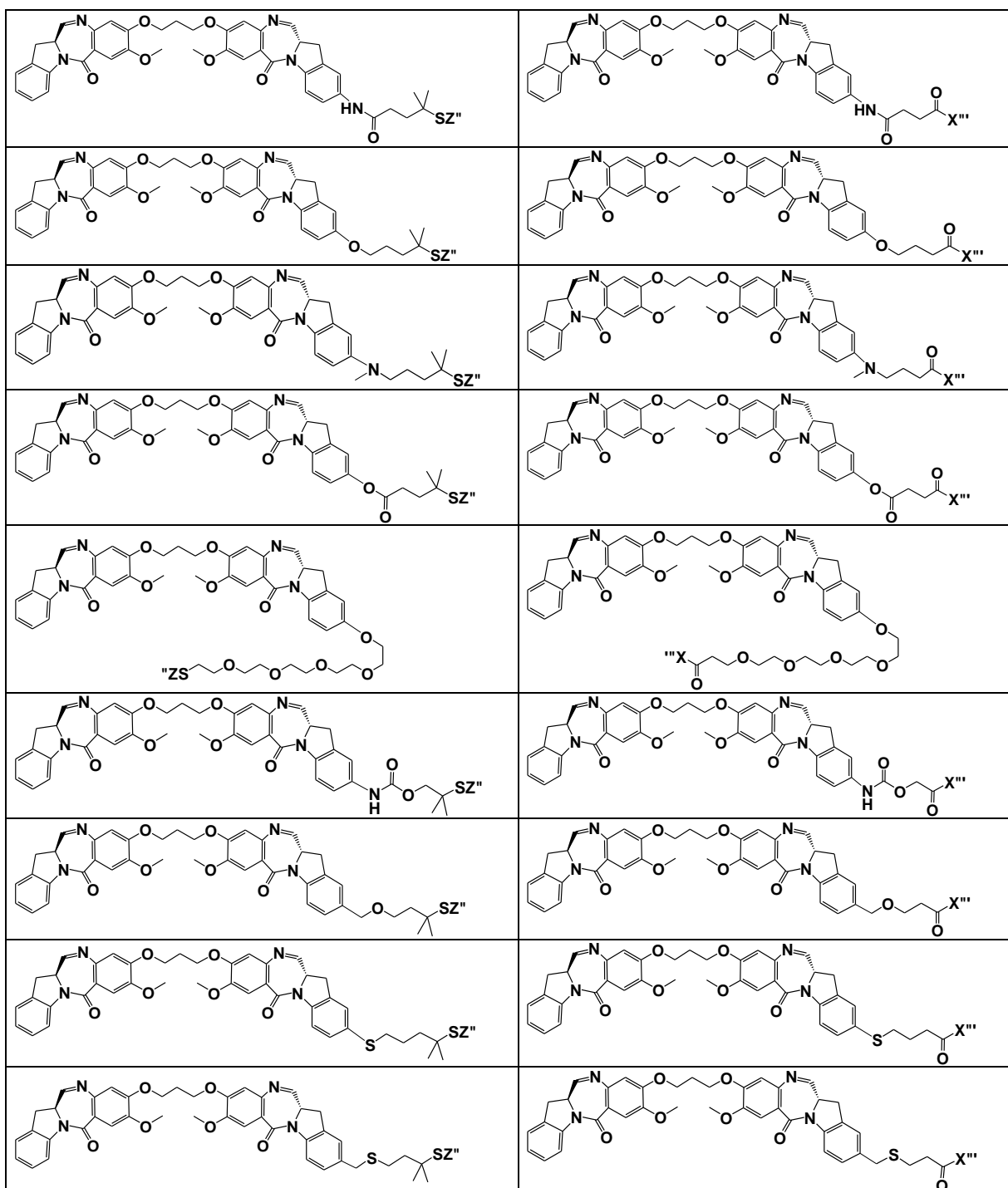
Структури типових лікарських речовин, які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом

Примітка: Z '' = H, SMe, SPy, SPy-NO<sub>2</sub>, Ac; X ''' = NHS;

Таблиця 12

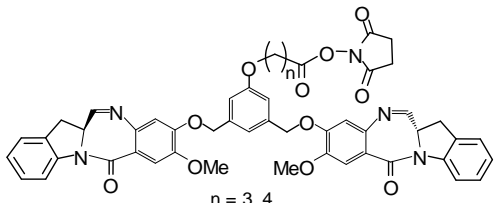
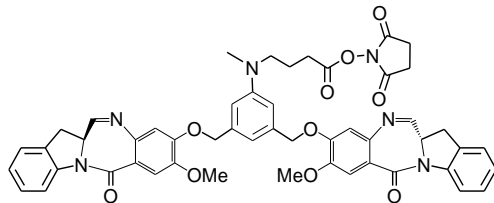
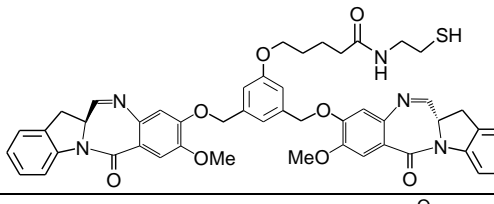
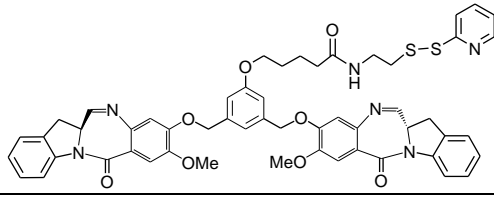
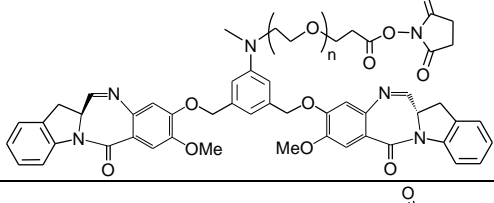
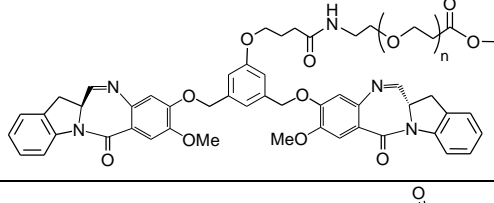
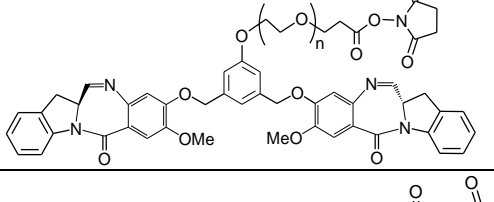
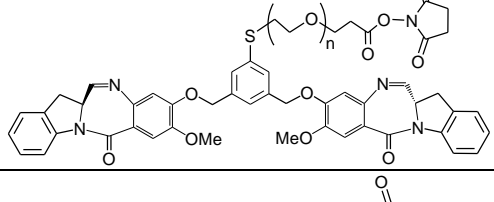
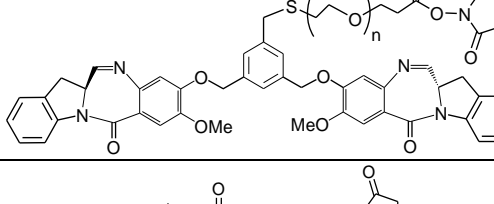
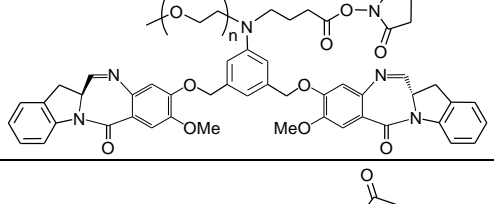
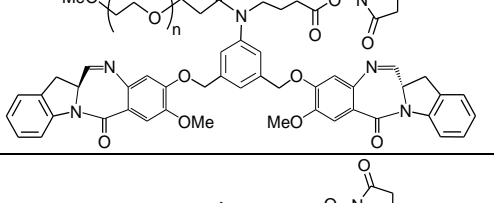
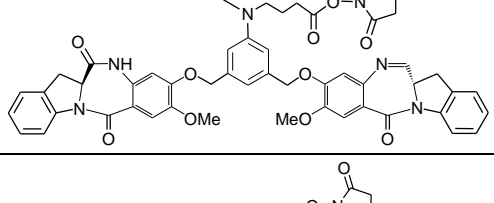
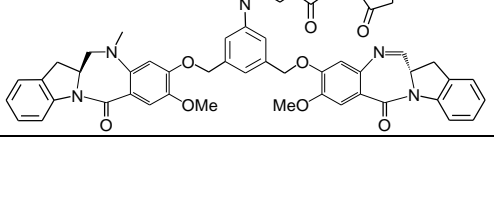
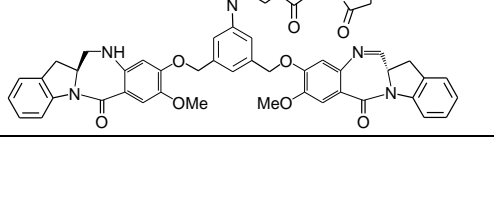
Структури типових лікарських речовин, які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом (продовження)

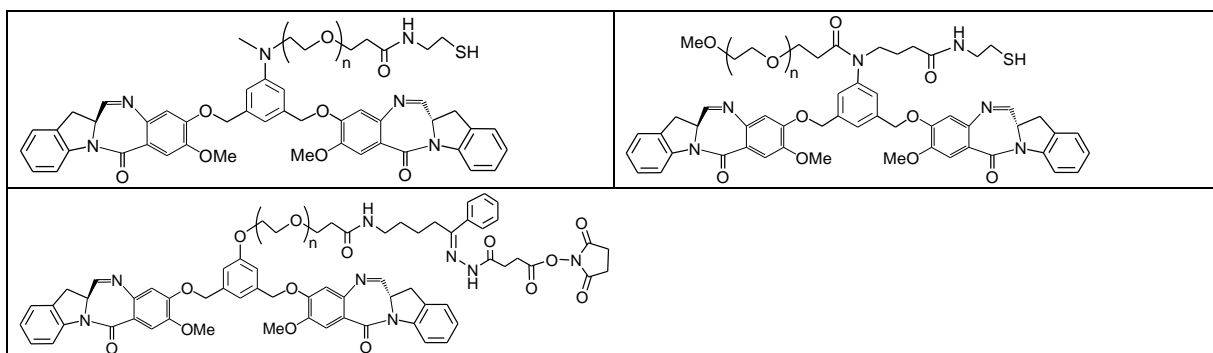


Примітка: Z ''= H, SMe, SPy, SPy-NO<sub>2</sub>, Ac; X '''= NHS;

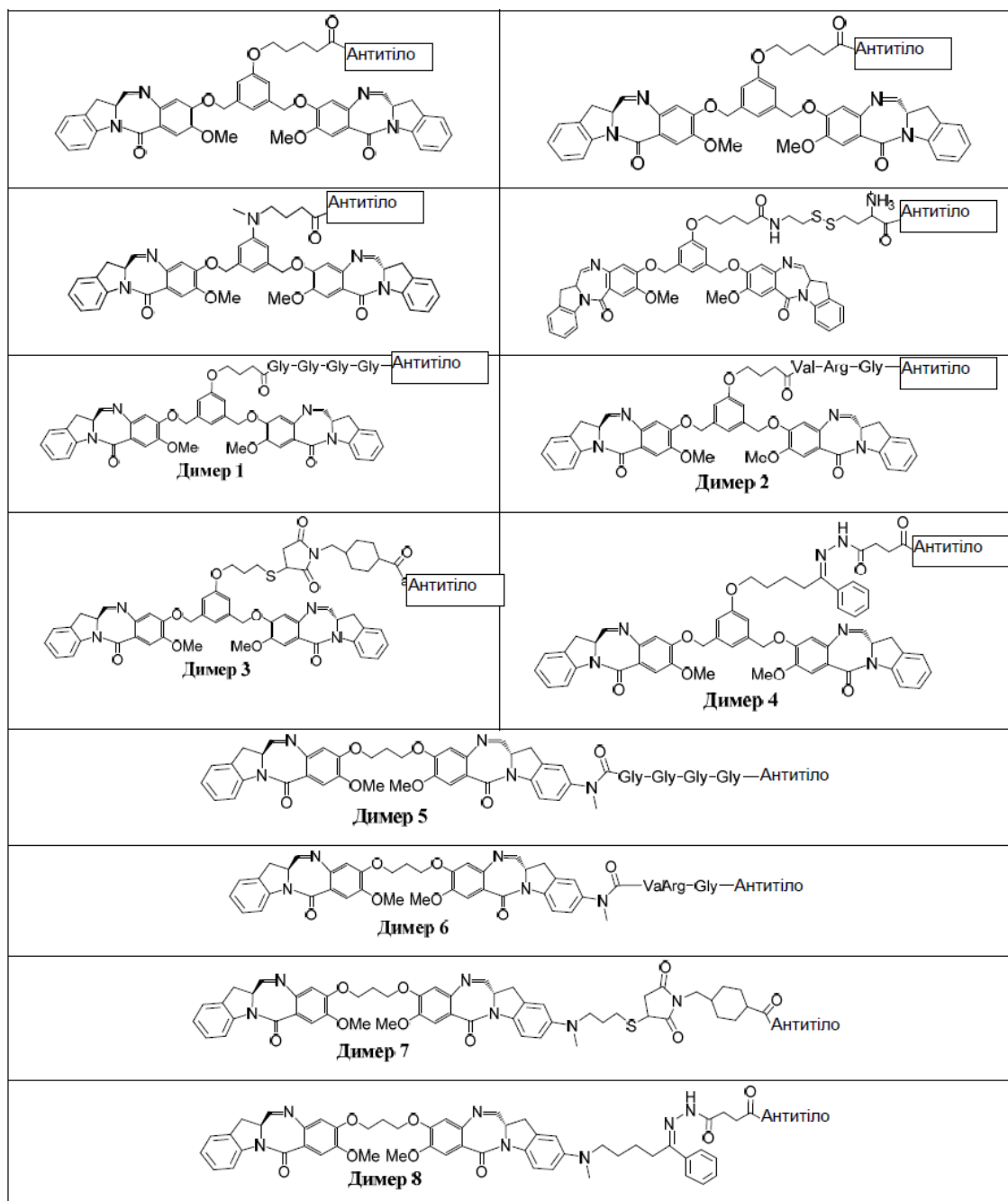
Таблиця 13

Структури типових лікарських речовин, які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом (продовження)



Таблиця 14. Структури типових кон'югатів, які можна виготовити згідно зі способами відповідно до даного винаходу



[231] Будь-які сполуки з Таблиць 11-13 і будь-які кон'югати з Таблиці 14 можуть містити щонайменше один з імінних зв'язків, взаємодіючих з досліджуваним реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, у такий спосіб утворюючи адукт, наприклад, адукт бісульфіту.

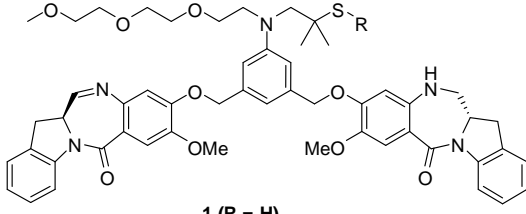
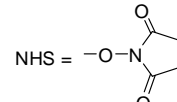
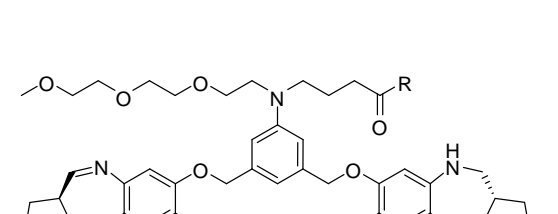
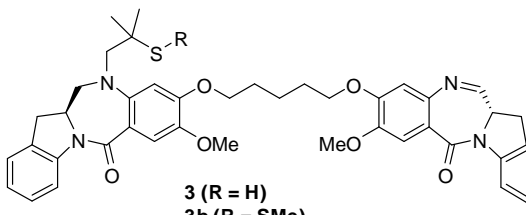
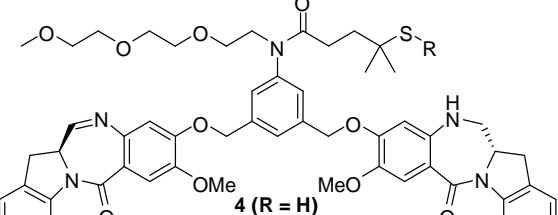
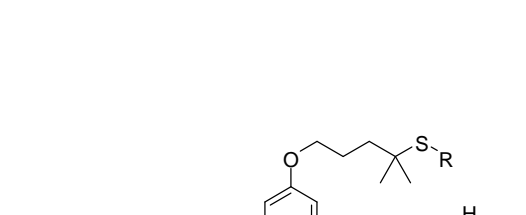
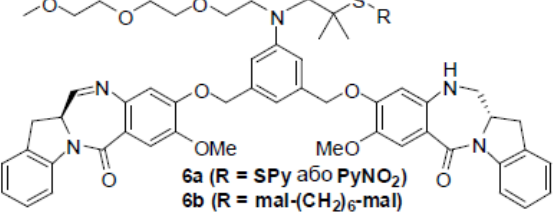
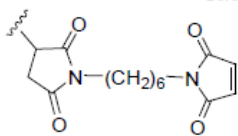
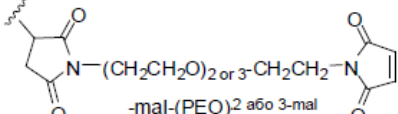
5 [232] В одному варіанті втілення імін-вмісна лікарська речовина, яка несе зв'язуючу групу, є сполуками, які мають реакційноздатну складноефірну групу, тіол або групу, здатну взаємодіяти з тіолами, описану вище.

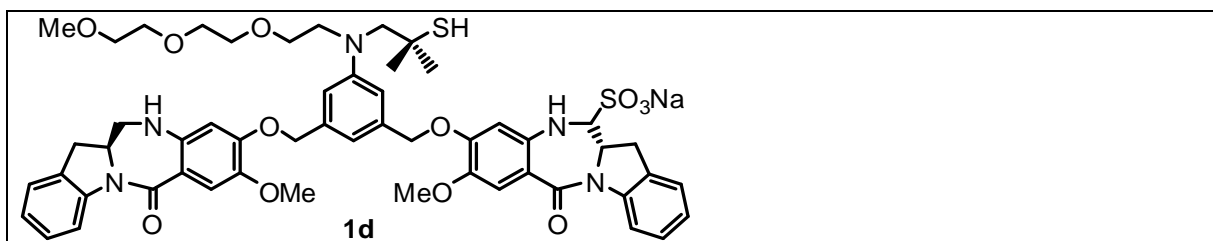
[233] Альтернативно вищеописана лікарська речовина може додатково взаємодіяти з біфункціональним зшиваючим агентом з утворенням лікарської речовини, яка несе зв'язуючу групу. Можна використовувати будь-які описані біфункціональні агенти, які зшивають.

10 [234] У ще одному кращому варіанті втілення лікарська речовина, яку можна використовувати в даному винаході, є будь-якою зі сполук, показаних у Таблиці 15.

Таблиця 15

Типові лікарські сполуки, які можна використовувати у способах згідно з даним винаходом

 <p>1 (R = H) 1b (R = SMe) 1c (R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHS)</p> <p>NHS = </p>	 <p>2 (R = NHS) 2b (R = OMe) 2c (R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHS)</p>
 <p>3 (R = H) 3b (R = SMe) 3c (R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHS)</p>	 <p>4 (R = H) 4b (R = SMe) 4c (R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHS)</p>
 <p>5 (R = H) 5b (R = SMe) 5c (R = S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O)NHS)</p>	 <p>6a (R = SPy або PyNO<sub>2</sub>) 6b (R = mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-mal) 6c (R = mal-(PEO)<sub>2or3</sub>-mal)</p> <p> -mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-mal</p> <p> -mal-(PEO)<sub>2</sub> або 3-mal</p>



#### АГЕНТ, ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ ІЗ КЛІТИНАМИ

[235] Ефективність кон'югатів згідно з винаходом в якості терапевтичних агентів залежить від ретельного добору відповідного агента, який зв'язується із клітинами. Агенти, які зв'язуються із клітинами, можуть бути агентами будь-якого типу, відомого в цей час, або досліджуваними агентами і включають пептиди та непептидні сполуки. У загальному випадку вони можуть бути антитілами (зокрема, моноклональними антитілами), лімфокінами, гормонами, факторами росту, вітамінами (наприклад, фолатом і т.д., здатним зв'язуватися з рецептором поверхні клітин, наприклад, рецептором фолату), молекулами-переносниками поживних речовин (наприклад, трансферинном) або будь-якою іншою молекулою або речовиною, яка зв'язується із клітинами.

[236] У деяких варіантах втілення агенти, які зв'язуються із клітинами, є білками або поліпептидами, або сполуками, які включають білки або поліпептиди. Переважно білки або поліпептиди включають один або більше залишків Lys з -NH<sub>2</sub>-групами бічного ланцюга. У якості альтернативи або доповнення білки або поліпептиди включають один або більше залишків Cys. - Sh-групи бічного ланцюга залишків Cys можуть бути інтактними або можуть перебувати в складі дисульфідного зв'язку, який можна відновити. Краще відновлення дисульфідного(их) зв'язку(ів) не виявляє істотного негативного впливу на функцію зв'язування із клітинами білків або поліпептидів (наприклад, у випадку антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента відновлення дисульфідних зв'язків не приводить до істотного посилення дисоціації легких ланцюгів/важких ланцюгів).

[237] -NH<sub>2</sub>-групи бічного ланцюга Lys і/або - Sh-групи бічного ланцюга Cys можуть бути ковалентно з'єднані з лінкерами, які, у свою чергу, з'єднані з димерними сполуками згідно з винаходом, тим самим здійснюючи кон'югування агентів, які зв'язуються із клітинами, з димерними сполуками згідно з винаходом. Кожен білковий агент, який зв'язується із клітинами, можуть містити декілька -NH<sub>2</sub>-груп бічних ланцюгів Lys і/або - Sh-груп бічного ланцюга Cys, доступних для зв'язування сполуки згідно з винаходом за допомогою біфункціональних агентів, які зшивають.

[238] Зокрема, приклади агентів, які зв'язуються із клітинами, які можна використовувати, включають:

- поліклональні антитіла;
- моноклональні антитіла;

фрагменти антитіл, наприклад, Fab, Fab' і F(ab')<sub>2</sub>, Fv, мінітіла, діатіла, тритіла, тетратіла (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al. J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960), Kim et al., Mol. Cancer Ther., 7 : 2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6 : 343-357 (2006));

- інтерферони (наприклад, α, β, γ);

- лімфокіни, наприклад, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

- гормони, наприклад, інсулін, TRH (тиреотропін-рилізінг-гормон), МСГ (меланотропін-стимулюючий гормон), стероїдні гормони, наприклад, андрогени і естрогени;

- фактори росту і колонієстимулюючі фактори, наприклад, ЕФР, ТФР-альфа, FGF, ФРЕС, ГКСФ, МКСФ і ГМ-КСФ (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984));

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

- вітаміни, наприклад, фолат;

Білкові каркасні структури на основі консенсусної послідовності повторів фібронектину III типу (FN3) (також відомих як Centyrins; див. публікацію патенту США 2010/0255056, включену в даний документ за допомогою посилання);

Сконструйовані білки з анкіриновим повтором (DARPin; заявки на патент США під номерами 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100, включенні в даний документ за допомогою посилання, С. Zahnd et al. 2010, Cancer Res., 70; 1595-1605, включена в даний документ за допомогою посилання); і

Каркасні білки домена фібронектину (аднектини: заявки на патент США під номери

20070082365; 20080139791, включені в даний документ за допомогою посилання).

[239] Методики моноклональних антитіл забезпечують продукцію надзвичайно специфічних агентів, які зв'язуються із клітинами, у вигляді специфічних моноклональних антитіл. Особливо добре відомі в даній галузі методики створення моноклональних антитіл, які продукуються шляхом імунізації мишей, пацюків, хом'яків або будь-якого іншого ссавця антигеном, який представляє інтерес, наприклад, інтактною клітиною-мішенню, антигенами, виділеними із клітини-мішені, цільним вірусом, ослабленим цільним вірусом і вірусними білками, наприклад, білками оболонки вірусу. Крім того, можна використовувати сенсibilізовані клітини людини. Ще одним способом створення моноклональних антитіл є використання фагових бібліотек scFv (одноланцюгових варіабельних областей), зокрема, scFv людини (див., наприклад, Griffiths et al., патенти США під номерами 5885793 і 5969108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Крім того, можна використовувати антитіла з модифікованою поверхнею, описані в патенті США № 5639641, а також химерні та гуманізовані антитіла. Вибір підходящого агента, який зв'язується із клітинами, залежить від конкретної популяції клітин, які є потенційною мішенню, однак, в цілому переважними є моноклональні антитіла людини, якщо доступне відповідне антитіло.

[240] Наприклад, моноклональне антитіло MY9 є IgG<sub>1</sub>-антитілом миші, яке специфічно зв'язується з антигеном CD33 {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)}, і може використовуватися, якщо клітини-мішені експресують CD33, як при гострому мієлобластному лейкозі (ГМЛ). Агент, який зв'язує клітини, може бути будь-якою сполукою, здатною зв'язувати клітину специфічним або неспецифічним чином. Як правило, зазначені агенти можуть бути антитілами (зокрема, моноклональними антитілами і фрагментами антитіл), інтерферонами, лімфокинами, гормонами, факторами росту, вітамінами, транспортними молекулами поживних речовин (наприклад, трансферином) або будь-якою іншою молекулою або речовиною, яка зв'язується із клітинами.

[241] Якщо агент, який зв'язується із клітинами, є антитілом, він зв'язується з антигеном, який є поліпептидом, і може бути трансмембранною молекулою (наприклад, рецептором) або лігандом, наприклад, фактором росту. Типові антигени включають такі молекули як ренін; гормон росту, включаючи гормон росту людини і бичачий гормон росту; рилізінг-фактор гормона росту; паратиреоїдний гормон; тиреотропний гормон; ліпопротеїни; альфа-1-антитрипсин; А-ланцюг інсуліну; В-ланцюг інсуліну; проінсулін; фолікулостимулюючий гормон; кальцитонін; лютеїнізуючий гормон; глюкагон; фактори згортання крові, наприклад, фактор vms, фактор IX, тканинний фактор (TF) і фактор Вілебранда; антикоагулянти, наприклад, протеїн С; передсердний натрійуретичний фактор; сурфактант легенів; активатор плазміногена, наприклад, урокіназу, сечу людини або тканинний активатор плазміногена (t-Pa); бомбезин; тромбін; гемопоетичний фактор росту; фактори некрозу пухлин-альфа і -бета; енкефаліназу; RANTES (хемокін, який експресується і виділяється Т-клітинами при активації); макрофагальний білок запалення людини (MIP-1-Альфа); сироватковий альбумін, наприклад, людський сироватковий альбумін; мономеру інгібуючу субстанцію; А-ланцюг релаксину; В-ланцюг релаксину; прорелаксин; пептид, зв'язаний з гонадотропіном миші; мікробний білок, наприклад, бета-лактамазу; ДНазу; IgE; антиген, асоційований із цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTLA), наприклад, CTLA-4; інігбін; активін; фактор росту ендотелію судин (ФРЕС); рецептори гормонів або факторів росту; білок А або D; ревматоїдні фактори; нейротрофічний фактор, наприклад, нейротрофічний фактор кісток (BDNF), нейротрофін-3, -4, -5 або -6 (NT-3, NT-4, NT-5 або NT-6) або фактор росту нервів, наприклад, NGF-β; тромбоцитарний фактор росту (PDGF); фактор росту фібробластів, наприклад, aFGF і bFGF; рецептор 2 фактора росту фібробластів (FGFR2); епідермальний фактор росту (ЕФР); трансформуючий ростовий фактор (ТРФ), наприклад, ТРФ-альфа і ТРФ-бета, включаючи ТРФ-β1, ТРФ-β2, ТРФ-β3, ТРФ-β4 або ТРФ-β5; інсуліноподібний фактор росту-I і -II (ІФР-I і ІФР-II); дез(1-3)-ІФР-I (ІФР-I головного мозку); білки, який зв'язують інсуліноподібний фактор росту; ЕpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, рецептори ЕphA, рецептори ЕphB, рецептор фолату, FOLR1, мезотелін, cripto, альфавбета6, інтегрини, ФРЕС, VEGFR, EGFR, рецептор трансферину, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD-білки, такі як CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 або антитіло, яке зв'язується з одним або більше пухлиноасоційованих антигенів або рецепторів поверхні клітин, описаних у публікації патенту США № 20080171040 або публікації патенту США № 20080305044 і повністю включені за допомогою посилання; еритропоетин; остеоіндуктивні фактори; імунотоксини; кістковий морфогенетичний білок (КМБ); інтерферон, наприклад, інтерферон-альфа, -бета і -гама; колонієстимулюючі фактори (КСФ), наприклад, МКСФ, ГМ-КСФ

і ГКСФ; інтерлейкіни (IL), наприклад, від IL-1 до IL-10; супероксиддисмутази; Т-клітинні рецептори; поверхневі білки мембран; стимулятор гемолізу (DAF-фактор); вірусний антиген, наприклад, фрагмент оболонки ВІЛ; транспортні білки; "хомінг"-рецептори; адресини; регуляторні білки; інтегрини, наприклад, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 і VCAM; пухлиноасоційований антиген, наприклад, рецептор HER2, HER3 або HER4; ендоглін, с-Met, 1GF1R, PSGR, NGEF, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4 і фрагменти будь-якого з перерахованих вище поліпептидів.

[242] Альтернативно ГМ-КСФ, який зв'язується з мієлоїдними клітинами, можна використовувати в якості агента, який зв'язує хворі клітини при гострому мієлолейкозі. IL-2, який зв'язується з активованими Т-клітинами, можна використовувати для профілактики відторгнення трансплантата, для лікування і профілактики реакції трансплантат проти хазяїна, а також для лікування гострого Т-клітинного лейкозу. МСГ, який зв'язується з меланоцитами, можна використовувати для лікування меланоми, як і антитіла проти меланоми. Фолієву кислоту можна використовувати для спрямованого впливу на рецептор фолату, який експресується пухлинами яєчників і іншими пухлинами. Епідермальний фактор росту можна використовувати для спрямованого впливу на види плоскоклітинного раку, наприклад, рак легенів і голови, і ший. Соматостатин можна використовувати для спрямованого впливу на нейробластоми та інші типи пухлин.

[243] Рак молочної залози і яєчок може бути мішенню естрогену (або аналогів естрогену) або андрогену (або аналогів андрогену), відповідно, використовуваних у якості агентів, які зв'язуються із клітинами.

[244] В одному варіанті втілення агент, який зв'язується із клітинами, є гуманізованими моноклональними антитілами. У ще одному варіанті втілення агент, який зв'язується із клітинами, є huMy9-6 або іншими спорідненими антитілами, описаними в патентах США під номерами 7342110 і 7557189 (включених у даний опис за допомогою посилання). У ще одному варіанті втілення агент, який зв'язується із клітинами, є антитілом проти рецептора фолату, описаним у попередніх заявках США під номерами 61/307797, 61/346595, 61/413172 і заявці на патент США №13/033723 (опублікованій як US 2012-0009181 A1). Зміст усіх зазначених заявок повністю включений в даний документ за допомогою посилання.

[245] У деяких варіантах втілення агент, який зв'язується із клітинами, може бути моноклональним антитілом або його антиген-зв'язуючими фрагментами, критичними для зв'язування антигена з антитілом, описаних тут, наприклад, huMy9-6 або споріднених до нього антитіл, описаних у патентах США під номерами 7342110 і 7557189 (включених у даний документ за допомогою посилання). Зазначені похідні антитіл можуть містити практично однакові або ідентичні (1) CDR 3-області легкого ланцюга і/або важкого ланцюга; (2) CDR1, CDR2 і CDR 3-області легкого ланцюга і/або важкого ланцюга; або (3) області легкого ланцюга і/або важкого ланцюга, у порівнянні з антитілом, описаним тут. Послідовності в межах цих областей можуть містити консервативні амінокислотні заміни, у тому числі заміни всередині CDR-областей. Краще, щоб було не більше 1, 2, 3, 4 або 5 консервативних заміни. У деяких варіантах втілення похідні антитіл містять область легкого ланцюга і/або область важкого ланцюга, щонайменше на 90%, 95%, 99% або 100% ідентичні антитілу, описаному тут. Зазначені похідні антитіл можуть мати практично аналогічну специфічність зв'язування і/або спорідненість до антигена-мішені у порівнянні з антитілом, описаним тут. Переважно значення  $K_d$  і/або  $K_{off}$  похідних антитіл перебувають у межах 10-кратних (вище або нижче), 5-кратних (вище або нижче), 3-кратних (вище або нижче) або 2-кратних (вище або нижче) значень для антитіл, описаних тут. Зазначені похідні антитіл можуть бути повністю людськими антитілами або гуманізованими антитілами, або химерними антитілами. Похідні антитіл можна одержати будь-яким зі способів, відомих у даній галузі техніки.

[246] В одному варіанті втілення антитіло проти рецептора є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який специфічно зв'язує рецептор 1 фолату людини, причому зазначене антитіло включає: (а) CDR1 важкого ланцюга, який включає GYFMN (SEQ ID NO: 1); CDR2 важкого ланцюга, який включає RIHPYDGDTFYNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 2); і CDR3 важкого ланцюга, який включає YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3) і (б) CDR1 легкого ланцюга, який включає KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4), CDR2 легкого ланцюга, який включає RASNLEA (SEQ ID NO: 5); і CDR3 легкого ланцюга, який включає QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); де Xaa<sub>1</sub> вибрана із K, Q, H і R; Xaa<sub>2</sub> вибрана із Q, H, N і R; а Xaa<sub>3</sub> вибрана із G, E, T, S, A і V. Переважно послідовність CDR2 важкого ланцюга включає RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

[247] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який специфічно зв'язує рецептор 1



фолату людини, який включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність: QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQG KATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

[248] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який кодується плазмідною ДНК, депонованою в ATCC 7 квітня 2010 року, яка має номери депонування ATCC PTA-10772 і PTA-10773 або 10774.

[249] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який специфічно зв'язує рецептор 1 фолату людини, який включає легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSG SGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); або  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSG SGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

[250] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який специфічно зв'язує рецептор 1 фолату людини, який включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9 або SEQ ID NO: 10. Краще антитіло включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

[251] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який кодується плазмідною ДНК, депонованою в ATCC 7 квітня 2010 року, і який має номери депонування ATCC PTA-10772 і PTA-10773 або 10774.

[252] У ще одному варіанті втілення антитіло проти рецептора фолату є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, який включає варіабельний домен важкого ланцюга, щонайменше приблизно на 90%, 95%, 99% або 100% ідентичний QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQG KATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11), і варіабельний домен легкого ланцюга, щонайменше приблизно на 90%, 95%, 99% або 100% ідентичний

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSG SGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 12); або  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSG SGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

[253] Агент, який зв'язує клітини, наприклад, антитіло, можна модифікувати гетеробіфункціональним зшиваючим агентом, який несе групу, здатну взаємодіяти з амінами, наприклад N-гідроксисукцинімідну групу (NHS-групу), здатну взаємодіяти з тіолами, малеїмідогрупу, вінілпіридин, вінілсульфон, вінілсульфонамід або групу на основі галоацетила, або тіолову групу.

[254] Тіолові залишки можна ввести до складу антитіла за допомогою ряду способів, відомих у даній галузі техніки, у тому числі: а) модифікації антитіла тіол-генеруючими реагентами, наприклад, 2-імінотіолану або тіолактону гомоцистеїну, або б) за допомогою реакції з дисульфід-вмісним гетеробіфункціональним зшиваючим агентом, наприклад, SPP, SPDP, SPDB, сульфо-SPDB, з наступним відновленням дисульфідного зв'язку DTT або TCEP, одержуючи вільний тіол, в) мутагенезом з метою введення неприродних залишків цистеїну, наприклад, цистеїн-сконструйовані антитіла (US2007/0092940 A1, US 2010/0003766 A1, US 7723485 B2), або г) відновлення нативних дисульфідних зв'язків (del Rosario, R. B. et al., Cancer Res. Suppl. 1990, 50, 804s-808s).

[255] Групу, здатну взаємодіяти з тіолами, наприклад, малеїмідо, вінілпіридин, вінілсульфон, вінілсульфонамід або групу на основі галоацетила можна ввести в антитіло шляхом його

модифікації гетеробіфункціональним зшиваючим агентом, який несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами (включаючи SPDB, N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноат, сульфо-SMCC, SMCC, LC-SMCC, KMUA, BMPS, GMBS, сульфо-GMBS, EMCS, сульфо-EMCS, AMAS, SVSB, SPP, NHS-(ПЕГ)n-mal, де n = 1-24, переважно 2, 4, 8, 12 і 24, але не обмежуючись ними).

- 5 Зшиваючі агенти, які включають групу на основі малеїмідогрупи, включають N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроат), який являє собою "довголанцюговий" аналог SMCC (LC-SMCC), N-сукцинімідильний ефір к-малеїмідоундеканової кислоти (KMUA), N-сукцинімідильний ефір γ-малеїмідомасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідний ефір ε-малеїмідокaproнової кислоти (EMCS), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідний ефір (MBS), N-(α-малеїмідоацетокси)-сукцинімідний ефір (AMAS), сукцинімідил-6-(β-малеїмідопропіонамідо)гексаноат (SMPH), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутират (SMPB) і N-(п-малеїмідифеніл)ізоціанат (PMPI). Описані сполуки, здатні взаємодіяти з тіолами, які містять вінілпіридин (Friedman M. et. Al. Int. J. Peptide Protein Res. 1974, 6, 183-185; Mak A. et. Al. Anal. Biochem. 1978, 84, 432-440). Описані сполуки, здатні взаємодіяти з тіолами, які містять вінілсульфонову групу (Masri M. S. J. Protein Chem., 1988, 7, 49-54; Morpurgo, M. et. Al. Bioconjugate Chem. 1996, 7, 363-368). Зшиваючі реагенти, які включають групу на основі галоацетилю, включають N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB), N-сукцинімідилйодоацетат (SIA), N-сукцинімідилбромоацетат (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромоацетамідо)пропіонат (SBAP).

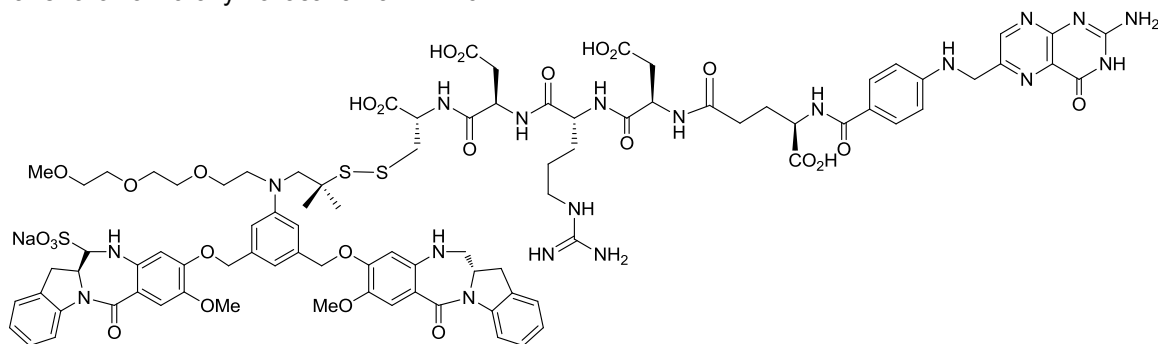
[256] Модифіковане антитіло можна очистити за допомогою будь-яких підходящих способів, відомих у даній галузі техніки, наприклад, гель-фільтрації, тонкоплівкової фільтрації або іонообмінної хроматографії, або афінної хроматографії.

- 25 [257] Усі посилання, наведені тут і в наведених нижче прикладах, спеціально повністю включені за допомогою посилання.

КОН'ЮГАТИ "АГЕНТ, ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ ІЗ КЛІТИНАМИ - ЛІКАРСЬКА РЕЧОВИНА"

- [258] Даний винахід забезпечує вдосконалені способи одержання кон'югатів агент, який зв'язується із клітинами/лікарська речовина, які включають агент, який зв'язується із клітинами, приєднаний до однієї або більше цитотоксичних сполук згідно з даним винаходом за допомогою різних лінкерів, включаючи дисульфідні лінкери, прості тіоефірні лінкери, лінкери на основі амідних зв'язків, пептидазо-лабільні лінкери, кислото-лабільні лінкери, естеразо-лабільні лінкери, але не обмежуючись ними.

- [259] Типові кон'югати, які можна виготовити за допомогою способів згідно з винаходом, включають антитіло/цитотоксична сполука, фрагмент антитіла/цитотоксична сполука, епідермальний фактор росту (ЕФР)/цитотоксична сполука, меланотропін (МСГ)/цитотоксична сполука, тиреотропін (ТТГ)/цитотоксична сполука, соматостатин/цитотоксична сполука, фолат/цитотоксична сполука, естроген/цитотоксична сполука, аналог естрогену/цитотоксична сполука, андроген/цитотоксична сполука і аналог андрогену/цитотоксична сполука. Типовий кон'югат фолат/цитотоксична сполука, який містить необов'язковий адукт -SO<sub>3</sub>Na при імінному зв'язку одного із двох мономерів лікарської речовини, зображений нижче. Типова схема синтезу зазначеного кон'югату показана на Фіг. 26.



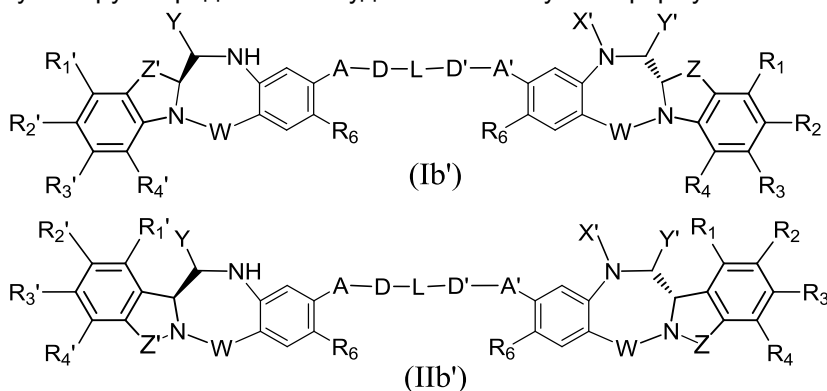
кон'югат фолат/цитотоксична сполука

- [260] У кращому варіанті втілення даний винахід забезпечує способи одержання кон'югатів, які включають індолінобензодіазепінову димерну сполуку (наприклад, формул (Ib'), (IIb'), (IAb'), (IIAb'), (IBb'), (IIBb'), (XIIIb'), (Xb') і т.д.) і агент, який зв'язується із клітинами, з'єднані за допомогою ковалентного зв'язку. Лінкер може розщеплюватися в області пухлини/небажаних проліферуючих клітин, доставляючи цитотоксичний агент до його мішені різними шляхами. Лінкер може бути розщепленим, наприклад, за низького pH (гідразон), у відновлюваному середовищі (дисульфід), шляхом протеолізу (амідний/пептидний зв'язок) або шляхом

ферментативної реакції (естеразної/глікозидазної).

[261] У кращому аспекті типові цитотоксичні кон'югати, які можна виготовити за допомогою способів згідно з винаходом, являють собою кон'югати антитіло/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, фрагмент антитіла/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, епідермальний фактор росту (ЕФР)/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, меланотропін (МСГ)/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, тиреотропін (ТТГ)/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, соматостатин/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, фолат/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, естроген/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, аналог естрогену/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, інгібітор простатоспецифічного мембранного антигена (PSMA)/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, інгібітор матриптази/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, сконструйовані білки з анкіриновими повторами (Darpin)/індолінобензодіазепінову димерну сполуку, андроген/індолінобензодіазепінову димерну сполуку і аналог андрогена/індолінобензодіазепінову димерну сполуку.

[262] Так, у чотирнадцятому специфічному варіанті втілення способи згідно з винаходом забезпечують одержання кон'югату, який включає: цитотоксичну сполуку і агент, який зв'язується із клітинами (СВА), причому зазначена цитотоксична сполука ковалентно зв'язана з СВА за допомогою зв'язуючої групи, і фрагмент кон'югату, і при цьому цитотоксична сполука і зв'язуюча група представлені будь-якою з наступних формул:



або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

Y являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $\text{HSO}_3$ ,  $\text{HSO}_2$  або сіль  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагіофосфат ( $\text{PO}_3\text{SH}_2$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  або сіль  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , тіосульфат ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  або сіль  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  або сіль  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^+$ , утворену катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^+\text{Na}^-$ ) або їх суміш, де  $\text{R}^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^i)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^j$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^l$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил; переважно Y являє собою адукт бісульфіту, гідросульфиту або метабісульфіту, або їх солі (наприклад, сіль натрію);

X 'вибрана із -H, амін-блокуючої групи, зв'язуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y 'вибрана із -H, оксогрупи, зв'язуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно

вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

$R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю або зв'язуючу групу;

- 5      кожна із  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' і зв'язуючої групи;

M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup>;

R, в будь-якому випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, амін-блокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

20      кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

25       $R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю або зв'язуючу групу;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, галоген або зв'язуючу групу;

30      Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ - і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ -;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

35      R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ -, амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ -;

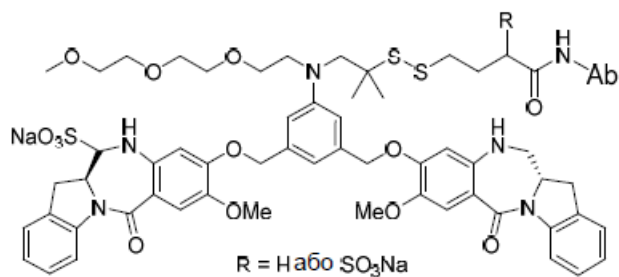
40      A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в будь-якому випадку незалежно, являє собою -H або, необов'язково, заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

45      D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ -;

50      L відсутня, являє собою зв'язуючу групу, мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ -, необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл або алкеніл, необов'язково, заміщені зв'язуючою групою, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце можуть бути, необов'язково, заміщені, причому замітник може включати зв'язуючу групу.

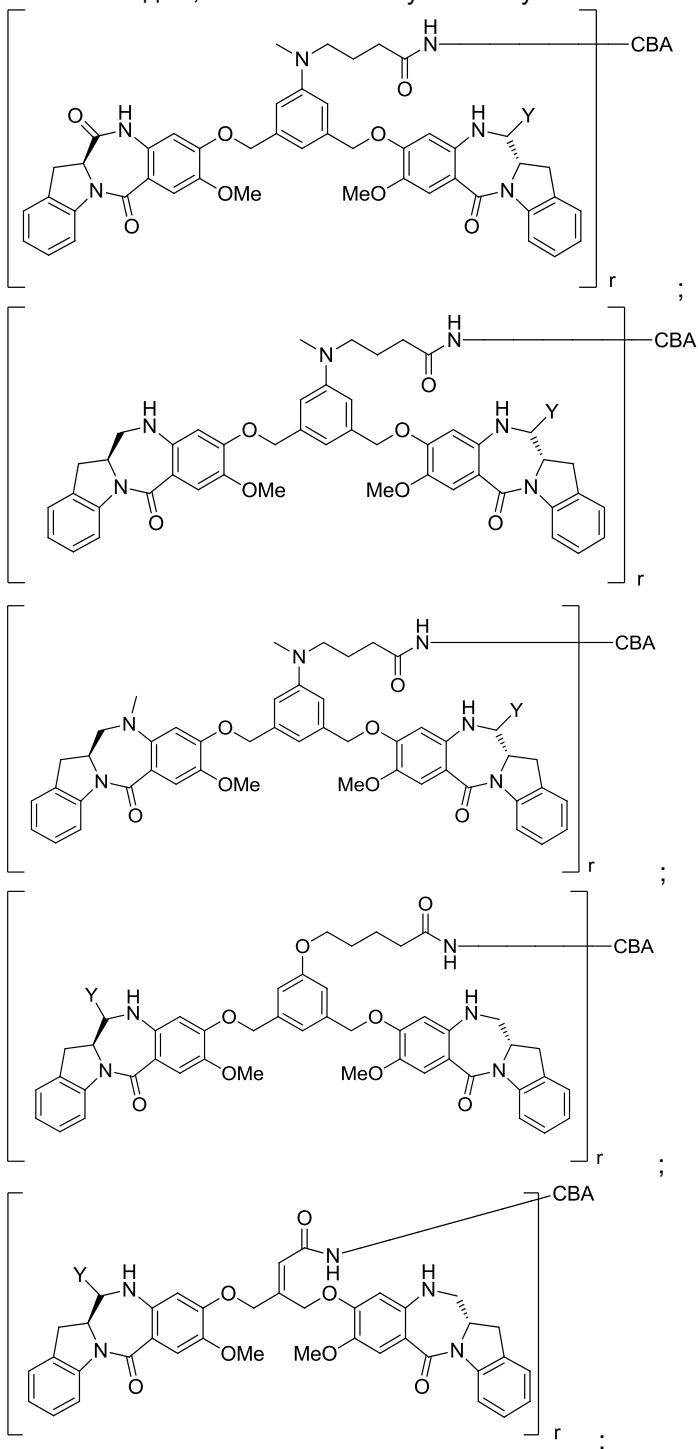
55      [263] Типовий кон'югат представлений нижче ("Ab" означає CBA, наприклад, антитіло):

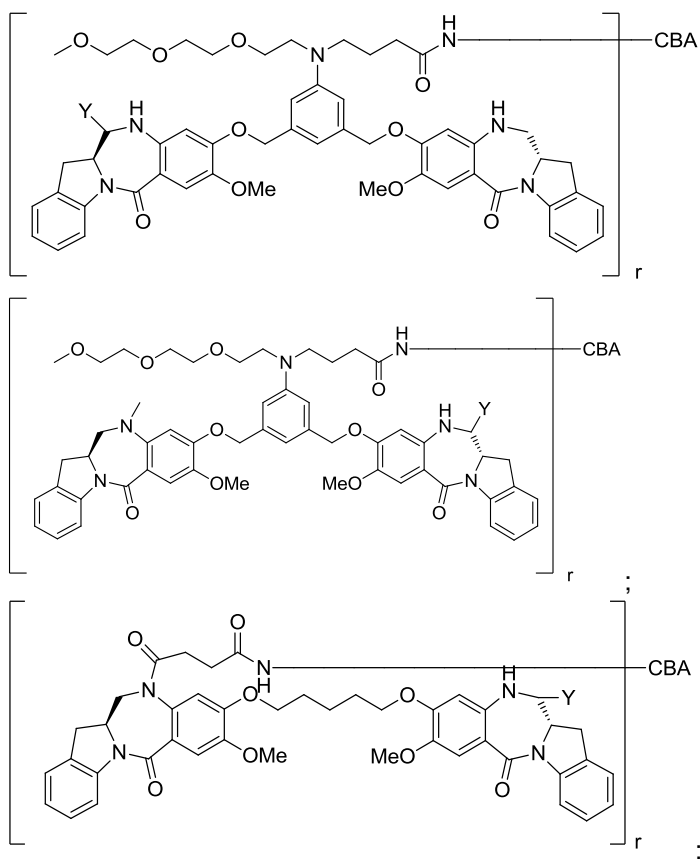


[264] У деяких варіантах втілення Y є  $-\text{SO}_2\text{M}$ ,  $-\text{SO}_3\text{M}$  або  $-\text{OSO}_3\text{M}$ .

[265] У деяких варіантах втілення кон'югати, які можна синтезувати згідно зі способами згідно з винаходом, включають наступні сполуки:

5



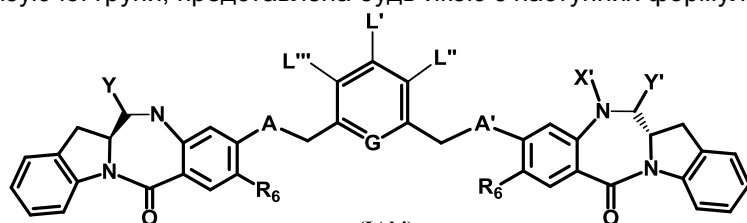


де:

- 5 СВА є агентом, який зв'язується із клітинами,  $r$  є цілим числом від 1 до 10,  $Y$  є -H, адуктом бісульфіту, гідросульфиту, метабісульфіту або їх солями, або  $-SO_3M$ , а  $M$  є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

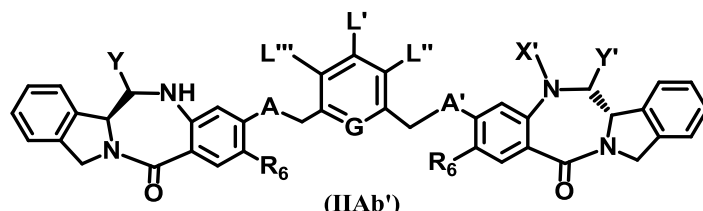
- [266] У деяких варіантах втілення L відсутня або вибрана з необов'язково заміщеної фенільної групи і необов'язково заміщеної піридиньної групи, де фенільна і піридиньна група несе зв'язуючу групу, або L є аміногрупою, яка несе зв'язуючу групу (тобто -N(зв'язуюча група)-), або L є лінійним, розгалуженим або циклічним алкілом або алкенілом, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і несе зв'язуючу групу.

[267] У п'ятнадцятому специфічному варіанті втілення цитотоксична сполука, приєднана до зв'язуючої групи, представлена будь-якою з наступних формул:



(IAb')

або



(IIAb')

де:

- 15  $L'$ ,  $L''$  і  $L'''$  є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR',

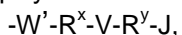
сульфону, представленого  $-\text{SO}_2\text{R}'$ , сульфонату  $-\text{SO}_3\text{M}$ , сульфату  $-\text{OSO}_3\text{M}$ , сульфонамиду, представленого  $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ціаногрупи, азидної групи,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{CONR}'\text{R}''$  і зв'язуючої групи, за умови, що тільки одна із  $\text{L}'$ ,  $\text{L}''$  і  $\text{L}'''$  являє собою зв'язуючу групу; а

5  $\text{G}$  вибрана із  $-\text{CH}-$  або  $-\text{N}-$ . Інші групи відповідають опису, наведеному вище в чотирнадцятому специфічному варіанті втілення.

[268] У деяких варіантах втілення одна з  $\text{L}'$ ,  $\text{L}''$  або  $\text{L}'''$  являє собою зв'язуючу групу, а інші є -H. Переважно  $\text{L}'$  являє собою зв'язуючу групу, а  $\text{L}''$  у  $\text{L}'''$  є -H.

[269] У деяких варіантах втілення  $\text{A}$  і  $\text{A}'$  обидві є  $-\text{O}-$ ,  $\text{R}_6$  являє собою  $-\text{OMe}$ , а  $\text{G}$  являє собою  $-\text{CH}-$ .

10 [270] У шістнадцятому специфічному варіанті втілення  $\text{L}'$  представлена наступною формулою:



де:

15  $\text{W}'$  і  $\text{V}$  є однаковими або різними і кожна із них, незалежно, відсутня або вибрана із  $-\text{CR}^e\text{R}^e-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ ,  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ ,  $-\text{SS}-$  або  $-\text{C}(=\text{O})-$ , або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

20  $\text{R}^x$  і  $\text{R}^y$  є однаковими або різними і кожна із них, незалежно, відсутня або являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

25  $\text{R}^e$  і  $\text{R}^e$  є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , де  $\text{R}^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-\text{NHR}^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $\text{R}^{101}$  і  $\text{R}^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна  $\text{R}^{101}$  і  $\text{R}^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

п являє собою ціле число від 1 до 24; а

30  $\text{J}$  ковалентно зв'язана з CBA і вибрана із сукциніміду, ацетамідо,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SS}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}(\text{Me})\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{Me})_2\text{S}-$ ,  $-\text{NR}^{\text{c}1}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^{\text{c}1}-$ ,  $-\text{NR}^{\text{c}1}\text{N}-$  і  $-\text{C}(=\text{O})-$ , де  $\text{R}^{\text{c}1}$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю.

35 [271] У деяких варіантах втілення  $\text{J}$  являє собою  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SS}-$ , сукцинімід або  $-\text{C}(=\text{O})-$ .

[272] У деяких варіантах втілення  $\text{R}^e$  являє собою -H або -Me;  $\text{R}^e$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ; п являє собою ціле число від 2 до 8;  $\text{R}^k$  являє собою -H, -Me або  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NMe}_2$ , а інші змінні відповідають опису, наведеному вище в п'ятнадцятому специфічному варіанті втілення.

40 [273] У деяких варіантах втілення  $\text{V}$  являє собою амінокислоту або пептид, який має від 2 до 8 амінокислот.

[274] У деяких варіантах втілення  $\text{V}$  є валін-цитруліном, gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu.

[275] У деяких варіантах втілення

$\text{W}'$  являє собою  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$  або  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ;

45  $\text{R}^e$  являє собою H, лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ;

$\text{R}^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

$\text{V}$  відсутня або являє собою  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ;

50  $\text{R}^y$  відсутня або являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а

$\text{J}$  являє собою  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SS}-$  або  $-\text{C}(=\text{O})-$ , а інші групи відповідають визначенню в шістнадцятому специфічному варіанті втілення.

[276] У деяких варіантах втілення

$\text{W}'$  являє собою  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$  або  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ;

55  $\text{R}^e$  являє собою -H, -Me або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{Me}$ ;

п являє собою ціле число від 2 до 6;

$\text{R}^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який несе від 1 до 6 атомів вуглецю;

$\text{V}$  і  $\text{R}^y$  відсутні; а

Я являє собою  $-C(=O)-$ . Інші групи відповідають визначенню в шістнадцятому специфічному варіанті втілення.

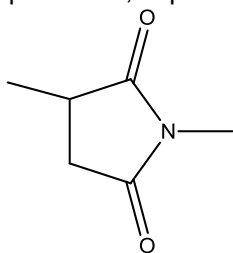
[277] У сімнадцятому специфічному варіанті втілення L' із шістнадцятого специфічного варіанту втілення представлена наступною формулою:

5  $-W'-[CR_1''R_2'']_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3''R_4'']_b-C(=O)-$ ,  
де:

кожна із  $R_1''$ ,  $R_2''$  і  $R_3''$ , незалежно, являє собою -H або лінійний, або розгалужений алкіл, який несе від 1 до 4 атомів вуглецю, переважно -Me;

10  $R_4''$  являє собою -H, лінійний або розгалужений алкіл, який несе від 1 до 4 атомів вуглецю (переважно -Me),  $-SO_3H$  або  $-SO_3^-M^+$ , де  $M^+$  являє собою фармацевтично прийнятний катіон;  
а являє собою цілі числа від 0 до 5 (наприклад, від 0 до 2, 3, 4 або 5), а b - ціле число від 0 до 6 (наприклад, від 0 до 3, 4, 5 або 6); а

Су являє собою, необов'язково, заміщене 5-членне гетероциклічне кільце, яке несе гетероатом N, переважно Су являє собою



15

[278] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому або сімнадцятому специфічному варіанті втілення,  $W'$  є  $-N(Re)-$ .

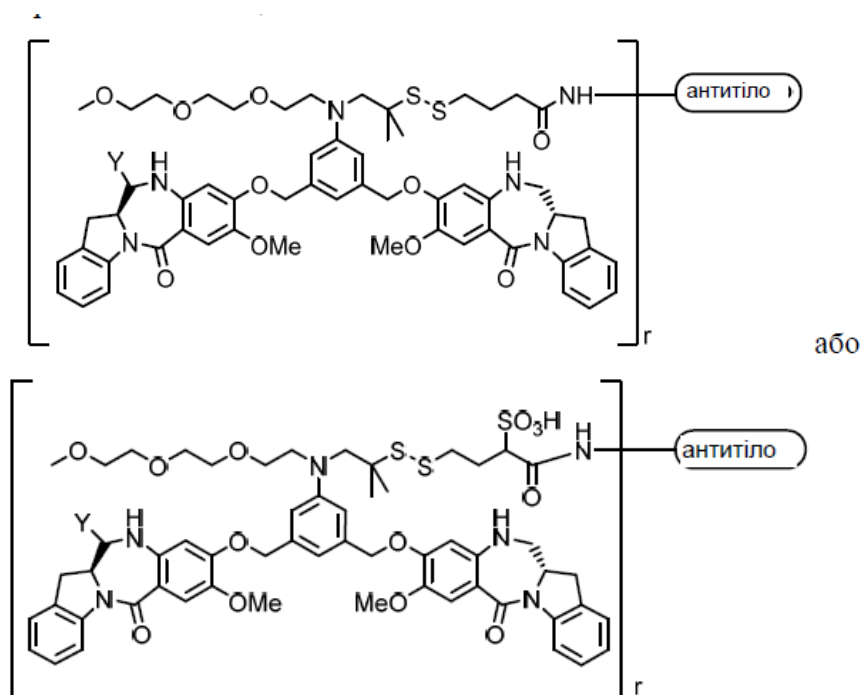
20 [279] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому або сімнадцятому специфічному варіанті втілення,  $R^e$  являє собою  $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$ , де  $R^k$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[280] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому або сімнадцятому специфічному варіанті втілення, V є -S- або -SS-.

[281] У вісімнадцятому специфічному варіанті втілення L' із шістнадцятого або сімнадцятого специфічного варіанту втілення представлена наступною формулою:

25  $-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-[CR_3''R_4'']_b-C(=O)-$ .

[282] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому-сімнадцятому специфічних варіантах втілення, кон'югат являє собою:



30

де r є цілим числом від 1 до 10, Y є  $-SO_3M$ , а M є -H або фармацевтично прийнятним



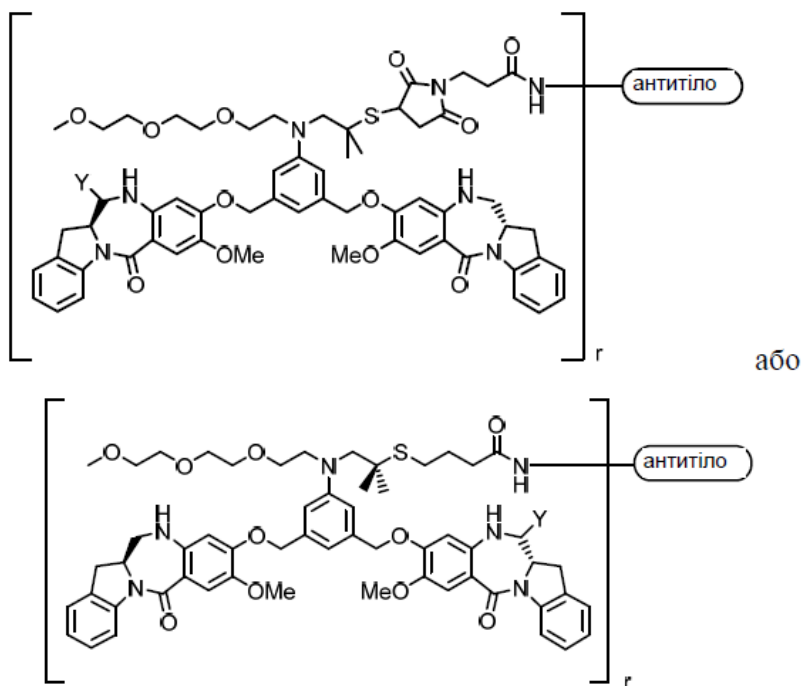
катионом.

[283] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому-вісімнадцятому специфічних варіантах втілення, антитіло є huM9-6.

[284] У дев'ятнадцятому специфічному варіанті втілення L' із шістнадцятого або  
5 сімнадцятого специфічного варіанту втілення представлена наступною формулою:

$$-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-Cy-[CR_3''R_4'']_b-C(=O)-.$$

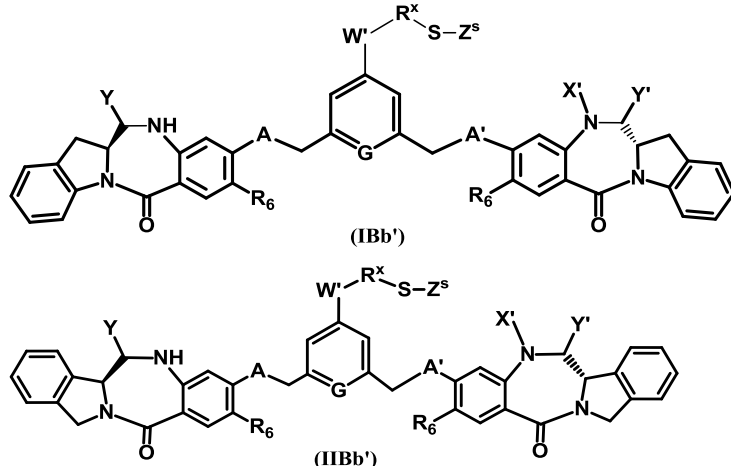
[285] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому, сімнадцятому і дев'ятнадцятому специфічних варіантах втілення, кон'югат являє собою:



де  $g$  є цілим числом від 1 до 10,  $Y$  є  $-SO_3M$ , а  $M$  є  $-H$  або фармацевтично прийнятним катіоном.

[286] У деяких варіантах втілення, наприклад, у шістнадцятому, сімнадцятому і дев'ятнадцятому специфічних варіантах втілення, антитіло є huMy9-6.

[287] У двадцятому специфічному варіанті втілення цитотоксична сполука, приєднана до зв'язуючої групи, представлена наступною формулою:



де:

W' відсутня або вибрана із -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S-, -CH<sub>2</sub>-S- або -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-.

<sup>x</sup> R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

$R^e$  являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-NHR^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-NR^{101}R^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $R^{101}$  і  $R^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

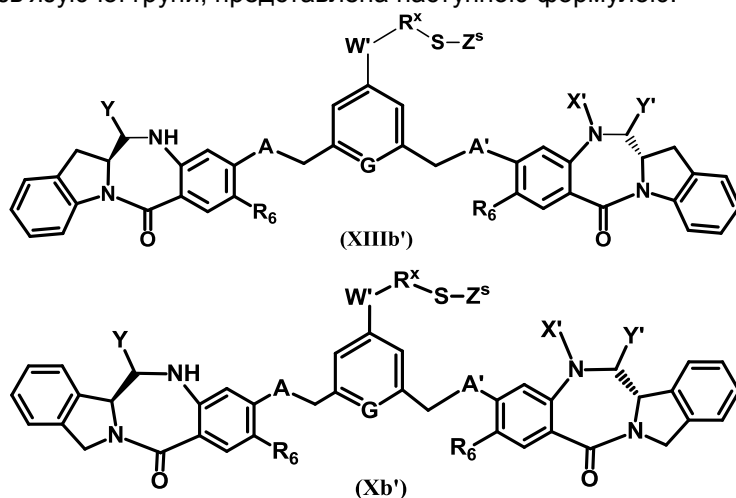
$Z^s$  приєднана до CBA і являє собою вуглець-вуглецевий зв'язок або  $-SR^m$ ;

$R^m$  являє собою  $R^d$  або заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, який несе реакційноздатний складний ефір, вибраний із N-гідроксисукцинімідних ефірів, N-гідроксифталімідних ефірів, N-гідроксисульфосукцинімідних ефірів, пара-нітрофенілових ефірів, динітрофенілових ефірів і пентафторофенілових ефірів;

$R^d$  вибрана із фенілу, нітрофенілу, динітрофенілу, карбоксинітрофенілу, піридилу або нітропіридилу; а

n являє собою ціле число від 1 до 24, а інші змінні відповідають опису, наведеному вище у восьмому або п'ятнадцятому специфічному варіанті втілення.

[288] У двадцять першому специфічному варіанті втілення цитотоксична сполука, приєднана до зв'язуючої групи, представлена наступною формулою:



де:

$W'$  відсутня або вибрана із  $-O-$ ,  $-N(R^e)-$ ,  $-N(R^e)-C(=O)-$ ,  $-N(C(=O)R^e)-$ ,  $-S-$ ,  $-CH_2-S-$  або  $-CH_2NR^e-$ ;

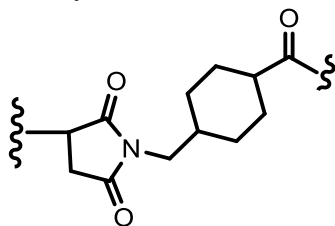
$R^x$  відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

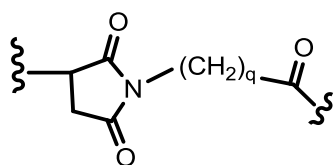
$R^e$  являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-NHR^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-NR^{101}R^{102}$ ), або 5- або 6-членний азот-вмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $R^{101}$  і  $R^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

n являє собою ціле число від 2 до 6;

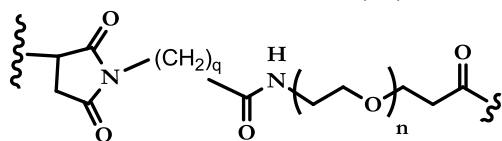
$Z^s$  приєднана до CBA і вибрана із:

зв'язку;

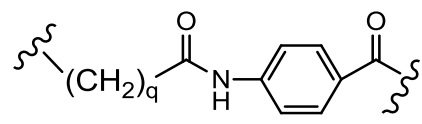




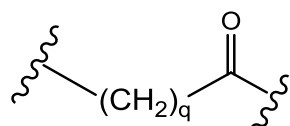
(b2);



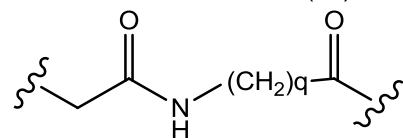
(b3);



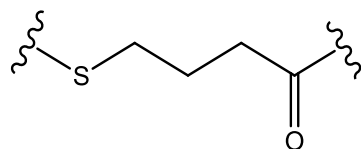
(b4);



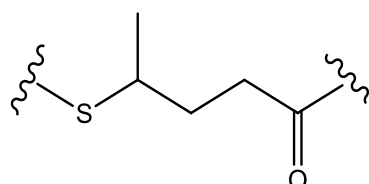
(b5);



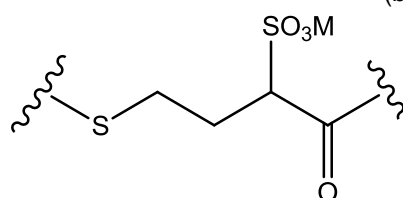
(b6);



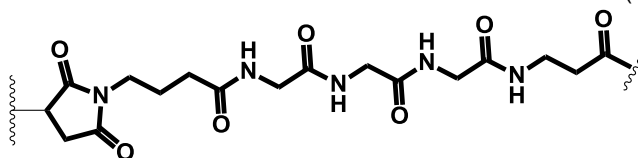
(b7);



(b8);



(b9) i



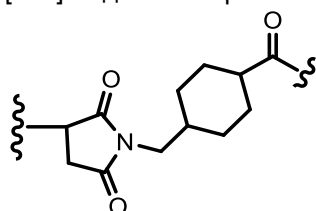
(b10),

де:

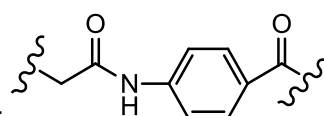
q являє собою ціле число від 1 до 5; а

M є -H або фармацевтично прийнятним катіоном, наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

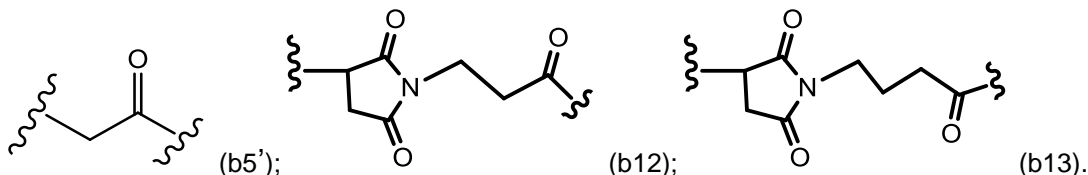
[289] У деяких варіантах втілення Z<sup>s</sup> представлена будь-якою з наступних формул:



(b1);



(b4');



[290] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $W'$  є  $-N(Re)-$ .

5 [291] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $R^e$  являє собою  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою  $-H$ , лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[292] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $R^k$  являє собою  $-H$  або  $-Me$ ,  $n$  дорівнює 4, а  $q$  дорівнює 2.

10 [293] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

[294] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $R^x$  являє собою  $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ , де кожна із  $R^f$  і  $R^g$  незалежно вибрана із  $H$  або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а  $p$  дорівнює 0, 1, 2 або 3.

15 [295] У деяких варіантах втілення, наприклад, в 21-му специфічному варіанті втілення,  $R^f$  і  $R^g$  є однаковими або різними і вибрані із  $-H$  і  $-Me$ ; а  $p$  дорівнює 1.

[296] У двадцять другому специфічному варіанті втілення, кон'югат формули (VIIIb') і (Xb'), а також описаний у двадцять першому специфічному варіанті втілення, змінні відповідають опису, наведеному нижче:

У являє собою  $-SO_3M$ ;

20 М являє собою  $-H$  або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад,  $Na^+$ );

як  $X'$ , так і  $Y'$  є  $-H$ ;

як А, так і А' є  $-O-$ ;

$R_6$  являє собою  $-OMe$ ; а

$R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

25 [297] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 21-й,  $Y$  вибрана із  $-SO_3M$ ,  $-SO_2M$  і сульфату  $-OSO_3M$ . Переважно  $Y$  являє собою  $-SO_3M$ . Переважно  $M$  являє собою  $-H$ ,  $Na^+$  або  $K^+$ .

[298] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й,  $W$ , якщо присутній, є  $C=O$ .

30 [299] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й,  $Z$  і  $Z'$ , якщо присутні, є  $-CH_2-$ .

[300] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й,  $X'$  вибрана із групи, яка складається з  $-H$ ,  $-OH$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу, зв'язуючої групи і амін-блокуючої групи. У деяких варіантах втілення  $X'$  є  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-Me$  або зв'язуючою групою. Переважно  $X'$  є  $-H$ .

35 [301] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й,  $Y'$  вибрана із групи, яка складається з  $-H$ , оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. Переважно  $Y'$  являє собою  $-H$  або оксогрупу. Більш переважно  $-H$ .

40 [302] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й, А і А' є однаковими або різними, і вибрані з  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R_5)-$  і оксогрупи ( $C=O$ ). Переважно А і А' є однаковими або різними і вибрані з  $-O-$  і  $-S-$ . Більш переважно А і А' є  $-O-$ .

45 [303] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 22-й, D і D', якщо присутні, є однаковими або різними і незалежно вибрані з мономера поліетиленгліколю  $(-OCH_2CH_2)_n$ , де  $n$  є цілим числом від 1 до 24, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, або лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, де алкіл, алкеніл і алкініл, необов'язково, заміщені одним або більше заміників, незалежно вибраних із групи, яка складається з галогену,  $-OR$ ,  $-NR'COR''$ ,  $-SR$  і  $-COR'$ . Переважно D і D' являють собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю.

50 [304] У двадцять третьому специфічному варіанті втілення для сполук формули (Ibb') або (IIBb'), описаних у двадцятьому специфічному варіанті втілення, змінні відповідають опису, наведеному нижче:

55 У являє собою  $-SO_3M$ ;

М являє собою -Н або  $\text{Na}^+$ ;

як  $X'$ , так і  $Y'$  є -Н;

як А, так і  $A'$  є -О-;

$R_6$  являє собою -ОМе;

5  $R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю .

[305] Переважно  $R^x$  являє собою  $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CR}^f\text{R}^g)-$ , де кожна із  $R^f$  і  $R^g$ , незалежно, вибрана із -Н або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; р дорівнює 0, 1, 2 або 3. Більш переважно  $R^f$  і  $R^g$  є однаковими або різними і вибрані із -Н і -Ме, а р дорівнює 1.

10 [306] У двадцять четвертому специфічному варіанті втілення кон'югат згідно з даним винаходом, відповідно до опису в чотирнадцятому, п'ятнадцятому або двадцять першому специфічному варіанті втілення, представлений у такий спосіб:

У являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ , де М являє собою -Н або фармацевтично прийнятний катіон (наприклад,  $\text{Na}^+$ );

W являє собою  $\text{C}=\text{O}$ ;

15  $R_1, R_2, R_1', R_2', R_4$  і  $R_4'$  є -Н;

одна із  $R_3$  або  $R_3'$ , необов'язково, являє собою зв'язуючу групу, а інша являє собою -Н;

$R_6$  являє собою -ОМе;

$Z$  і  $Z'$  являють собою  $-\text{CH}_2$ ;

$X'$  являє собою -Н;

20  $Y'$  являє собою -Н; а

$A$  і  $A'$  являють собою -О- .

[307] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, Y вибрана із  $-\text{SO}_3\text{M}$ ,  $-\text{SO}_2\text{M}$  і сульфату  $-\text{OSO}_3\text{M}$ . Переважно Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ .

25 [308] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, M є -Н,  $\text{Na}^+$  або  $\text{K}^+$ .

[309] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, W, якщо присутній, є  $\text{C}=\text{O}$ .

30 [310] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, Z і  $Z'$ , якщо присутні, є  $-\text{CH}_2-$ .

35 [311] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й,  $X'$  вибрана із групи, яка складається з -Н, -ОН, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу, зв'язуючої групи і амін-блокуючої групи. У деяких варіантах втілення  $X'$  є -Н, -ОН, -Ме або зв'язуючою групою. У деяких варіантах втілення  $X'$  є -Н.

40 [312] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й,  $Y'$  вибрана із групи, яка складається з -Н, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю. У деяких варіантах втілення  $Y'$  є -Н або оксогрупою. У деяких варіантах втілення  $Y'$  є -Н.

45 [313] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, A і  $A'$  є однаковими або різними і вибрані з -О-, -S-,  $-\text{N}(\text{R}_5)-$  і оксогрупи ( $\text{C}=\text{O}$ ). У деяких варіантах втілення A і  $A'$  є однаковими або різними і вибрані з -О- і -S-. В деяких варіантах втілення A і  $A'$  є -О-.

50 [314] У будь-якому з вищеописаних специфічних варіантів втілення кон'югату згідно з даним винаходом, наприклад, у специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, D і  $D'$ , якщо присутні, є однаковими або різними і незалежно вибрані з мономера поліетиленгліколю  $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ , де n являє собою ціле число від 1 до 24, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, або лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, де алкіл, алкеніл і алкініл, необов'язково, заміщені одним або більше заміників, незалежно вибраних із групи, яка складається із галогену, -OR,  $-\text{NR}'\text{COR}''$ , -SR і -COR'. В деяких варіантах втілення D і  $D'$  являють собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю.

55 [315] У деяких варіантах втілення кон'югат згідно з будь-яким з описаних варіантів втілення, наприклад, специфічних варіантів втілення з 14-го по 24-й, може включати 1-10 цитотоксичних сполук, 2-9 цитотоксичних сполук, 3-8 цитотоксичних сполук, 4-7 цитотоксичних сполук або 5-6

цитотоксичних сполук, причому кожна цитотоксична сполука включає зв'язуючу групу, яка приєднує цитотоксичну сполуку до СВА, і всі цитотоксичні сполуки у складі кон'югату однакові.

[316] У деяких варіантах втілення кон'югат згідно з будь-яким з описаних варіантів втілення, наприклад, специфічних варіантів втілення з 14-го по 24-й, може включати 1-10 цитотоксичних сполук, 2-9 цитотоксичних сполук, 3-8 цитотоксичних сполук, 4-7 цитотоксичних сполук або 5-6 цитотоксичних сполук, причому кожна цитотоксична сполука включає зв'язуючу групу, яка приєднує цитотоксичну сполуку до СВА, і всі цитотоксичні сполуки у складі кон'югату однакові.

[317] У деяких варіантах втілення кон'югат згідно з будь-яким з описаних варіантів втілення, наприклад, специфічних варіантів втілення з 14-го по 24-й, може включати в цілому 1-10 цитотоксичних сполук та (немодифікованих) імін-вмісних цитотоксичних сполук, в цілому 2-9 цитотоксичних сполук і (немодифікованих) імін-вмісних цитотоксичних сполук, в цілому 3-8 цитотоксичних сполук і (немодифікованих) імін-вмісних цитотоксичних сполук, в цілому 4-7 цитотоксичних сполук і (немодифікованих) імін-вмісних цитотоксичних сполук, в цілому 5-6 цитотоксичних сполук і (немодифікованих) імін-вмісних цитотоксичних сполук, причому кожна цитотоксична сполука або (немодифікована) імін-вмісна цитотоксична сполука включає зв'язуючу групу, яка приєднує цитотоксичну сполуку або (немодифіковану) імін-вмісну цитотоксичну сполуку до СВА, і всі цитотоксичні сполуки або (немодифіковані) імін-вмісні цитотоксичні сполуки у складі кон'югату однакові (за винятком (бісульфитної) модифікації).

[318] У будь-якому з варіантів втілення кон'югатів, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, агент, який зв'язується із клітинами, може зв'язуватися із клітинами-мішенями, вибраними з пухлинних клітин, клітин, інфікованих вірусом, клітин, інфікованих мікроорганізмами, клітин, інфікованих паразитами, аутоімунних клітин, активованих клітин, мієлоїдних клітин, активованих Т-клітин, В-клітин або меланоцитів; клітин, які експресують CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, ЕpCAM, CanAg, CALLA або антигени HER-2, антигени Her-3; або клітин, які експресують рецептор інсуліноподібного фактора росту, рецептор епідермального фактора росту, рецептор фолату.

[319] У будь-якому з варіантів втілення кон'югатів, наприклад, специфічних варіантах втілення з 14-го по 24-й, агент, який зв'язується із клітинами, може бути антитілом, однокланцевим антитілом, фрагментом антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, моноклональним антитілом, однокланцевим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, химерним антитілом, фрагментом химерного антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, доменним антитілом, фрагментом доменного антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, лімфокином, гормоном, вітаміном, фактором росту, колонієстимулюючим фактором або молекулою транспорту поживних речовин.

[320] Антитіло може бути антитілом з модифікованою поверхнею, однокланцевим антитілом з модифікованою поверхнею або фрагментом антитіла з модифікованою поверхнею.

[321] Антитіло може бути моноклональним антитілом, однокланцевим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла.

[322] Антитіло може бути гуманізованим антитілом, гуманізованим однокланцевим антитілом або фрагментом гуманізованого антитіла.

[323] У будь-якому зі специфічних варіантів втілення, наведених тут, наприклад, специфічних варіантах втілення з 1-го по 24-й, реагент, здатний взаємодіяти з імінами, вибраний із групи, яка складається із сульфитів ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_2$  або солі  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  або  $\text{HSO}_2^-$ , утвореної катіоном), метабісульфіту ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або солі  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ , утвореної катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфатів ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_3$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_3$  або солі  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  або  $\text{PS}_4^{3-}$ , утвореної катіоном), складних ефірів тіофосфату ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{SH}$ ,  $\text{R}^i\text{SOH}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$ ), різних амінів (гідроксиламіну (наприклад,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ), гідразину (наприклад,  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ),  $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ ,  $\text{R}^i\text{NH}-\text{R}^i$ ,  $\text{NH}_2-\text{R}^i$ ),  $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ , тіосульфату ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$  або солі  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , утвореної катіоном), дитіоніту ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$  або солі  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , утвореної катіоном), фосфородитіоату ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$  або його солі, утвореної катіоном), гідроксамової кислоти ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$  або солі, утвореної катіоном), гідразиду ( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ ), формальдегідсульфоксилату ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$  або солі  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ , утвореної катіоном, наприклад,  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}^+$ ), глікозильованого нуклеотиду (наприклад, GDP-манози), флударабіну або їх суміші, де  $\text{R}^i$  і  $\text{R}^j$  незалежно являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщені щонайменше одним замісником, вибраним із  $-\text{N}(\text{R}^l)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  і  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^i$  і  $\text{R}^j$ , необов'язково, можуть бути додатково заміщені замісником для алкілу, описаним тут;  $\text{R}^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $\text{R}^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил.

[324] Переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, вибирають із сульфідів, гідроксиламіну, гідазину і сечовини. Більш переважно реагент, здатний взаємодіяти з імінами, є  $\text{NaHSO}_3$  або  $\text{KHSO}_3$ .

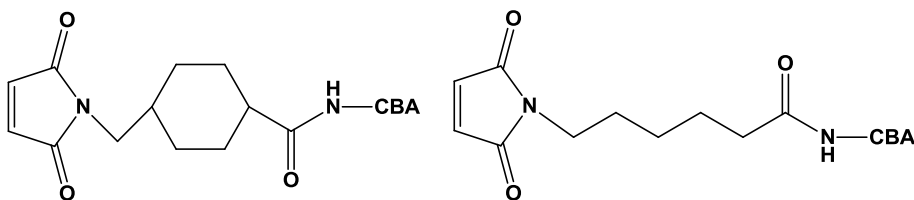
[325] У будь-якому зі специфічних варіантів втілення, наведених тут, наприклад, специфічних варіантах втілення з 1-го по 24-й, використовують від приблизно 0,1 до приблизно 30 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, відносно імін-вмісної цитотоксичної сполуки. У деяких варіантах втілення використовують від приблизно 1 до приблизно 10 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, відносно імін-вмісної цитотоксичної сполуки. У деяких варіантах втілення використовують від приблизно 3 до приблизно 5 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, відносно імін-вмісної цитотоксичної сполуки.

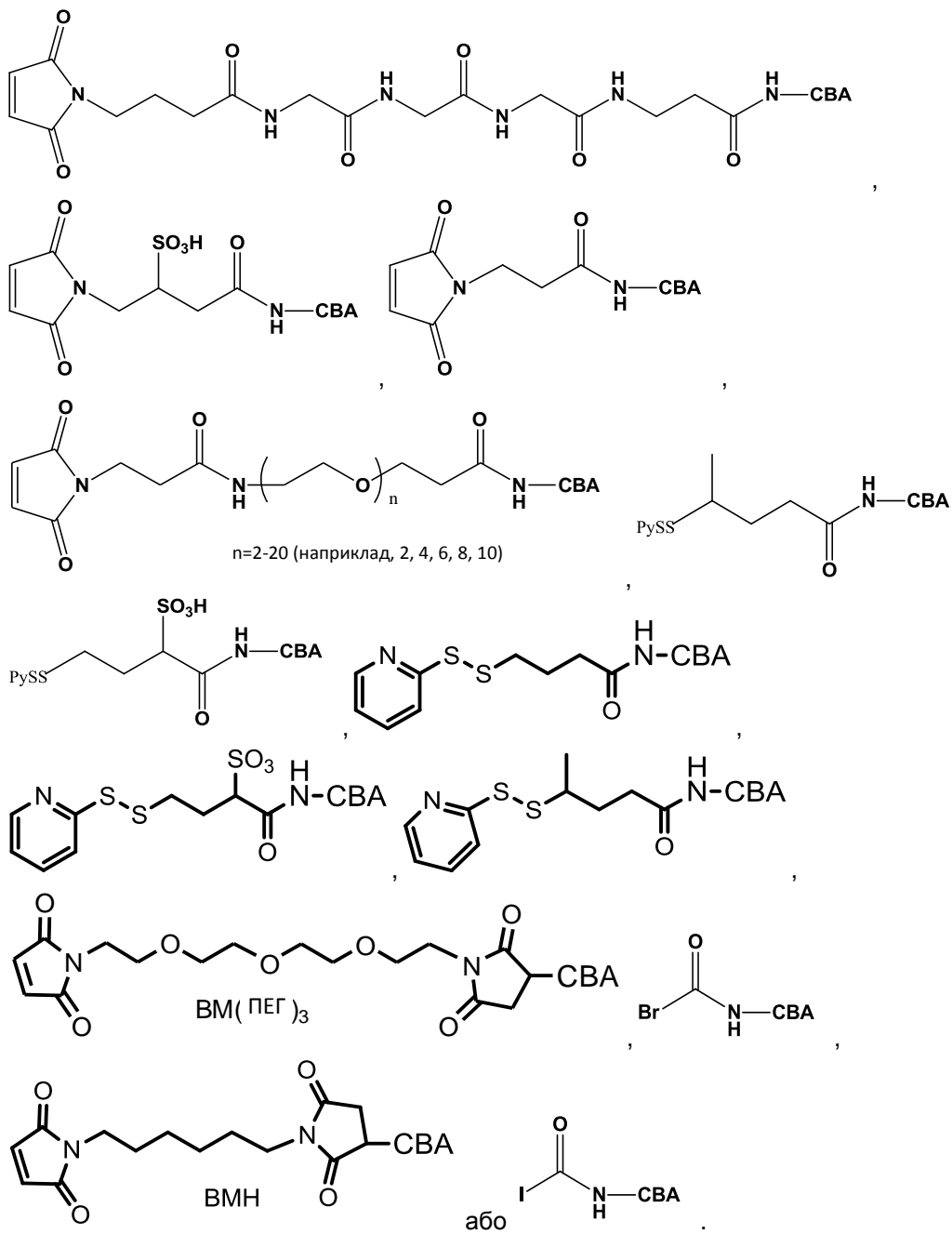
[326] У будь-якому зі специфічних варіантів втілення, наведених тут, наприклад, специфічних варіантів втілення з 1-го по 24-й, біфункціональний зшиваючий агент приєднує цитотоксичний агент до агента, який зв'язується з клітинами, за допомогою простого тіоефірного зв'язку і може містити групу на основі малеїмідогрупи або галоацетилу, причому біфункціональний зшиваючий агент, який містить групу на основі малеїмідогрупи, вибраний із: N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилату (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроату) (LC-SMCC), N-сукцинімідилового ефіру κ-малеїмідоундеканової кислоти (KMUA), N-сукцинімідилового ефіру γ-малеїмідомасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідного ефіру ε-малеїмідокапронової кислоти (EMCS), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідного ефіру (MBS), N-(α-малеїмідоацетокси)-сукцинімідного ефіру (AMAS), сукцинімідил-6-(β-малеїмідопропіонамідо)гексаноату (SMPH), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідофеніл)бутирату (SMPB), N-(п-малеїмідофеніл)ізоціанату (PMPI), N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату; а біфункціональний зшиваючий агент, який містить групу на основі галоацетилу, вибраний із: N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоату (SIAB), N-сукцинімідилйодоацетату (SIA), N-сукцинімідилбромоацетату (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромоацетамідо)пропіонату (SBAP), біс-малеїмідополіетиленгліколю (BMPEO),  $\text{BM(PEO)}_2$ ,  $\text{BM(PEO)}_3$ , N-(β-малеїмідопропілокси)сукцинімідного ефіру (BMPS), NHS 5-малеїмідовалеріанової кислоти, HBVS, гідразиду•HCl 4-(4-N-малеїмідофеніл)-масляної кислоти (MPBH), сукцинімідил-(4-вінілсульфоніл)бензоату (SVSB), дитіобіс-малеїмідоетану (DTME), 1,4-біс-малеїмідобутану (BMB), 1,4-біс-малеїмідил-2,3-дигідроксибутану (BMDDB), біс-малеїмідогексану (BMH), біс-малеїмідоетану (BMOE), сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC), сульфосукцинімідил(4-йодоацетил)амінобензоату (сульфо-SIAB), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру (сульфо-MBS), N-(γ-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-GMBS), N-(ε-малеїмідокапроїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-EMCS), N-(κ-малеїмідоундеканоїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-KMUS), сульфосукцинімідил-4-(п-малеїмідофеніл)бутирату (сульфо-SMPB), CX1-1, сульфо-Mal і ПЕГ<sub>n</sub>-Mal.

[327] У деяких варіантах втілення біфункціональний зшиваючий агент вибраний із групи, яка складається із SMCC, сульфо-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, біс-малеїмідогексану або BMPEO.

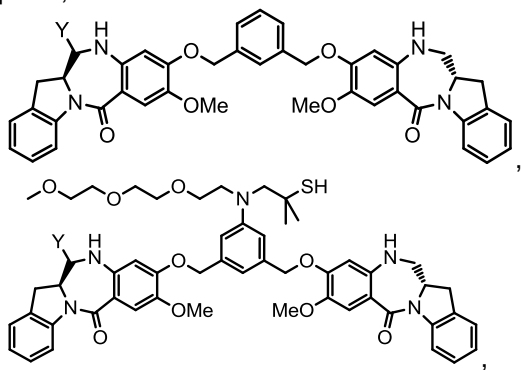
[328] У будь-якому з варіантів втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 1-го по 24-й, кон'югат очищують за допомогою тангенціальної проточної фільтрації, адсорбційної хроматографії, адсорбційної фільтрації, вибіркового осадження, неабсорбційної фільтрації або їх комбінації. Переважно кон'югат очищують за допомогою тангенціальної проточної фільтрації і/або адсорбційної хроматографії.

[329] У деяких варіантах втілення, наприклад, специфічних варіантах втілення з 1-го по 24-й, агент, який зв'язується із клітинами (CBA), який несе групу, здатну взаємодіяти з тіолами, являє собою:

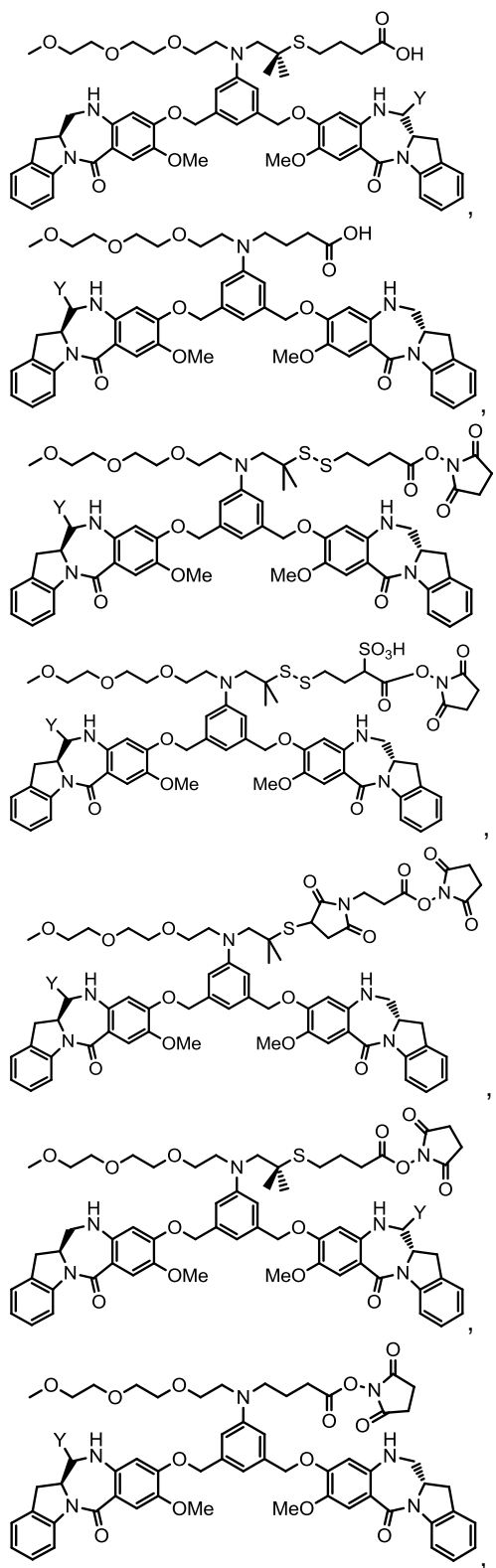


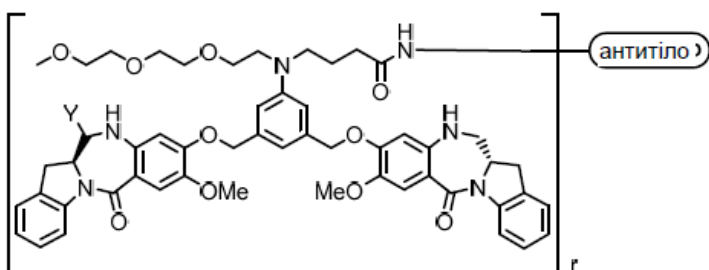
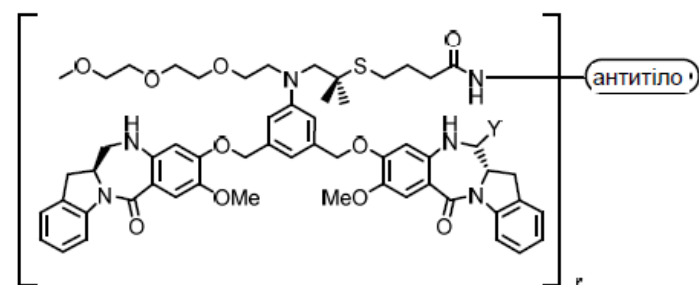
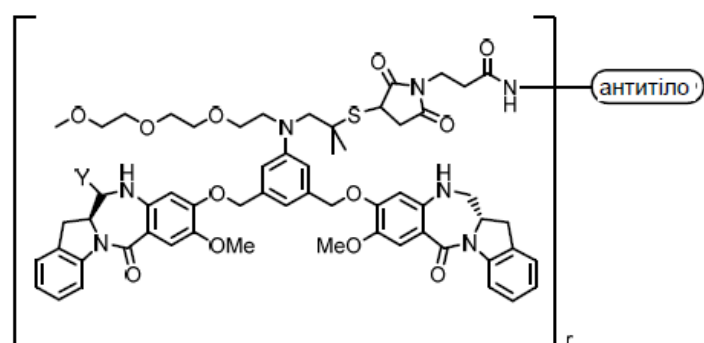
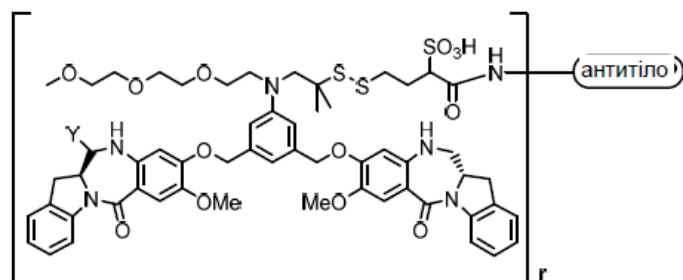
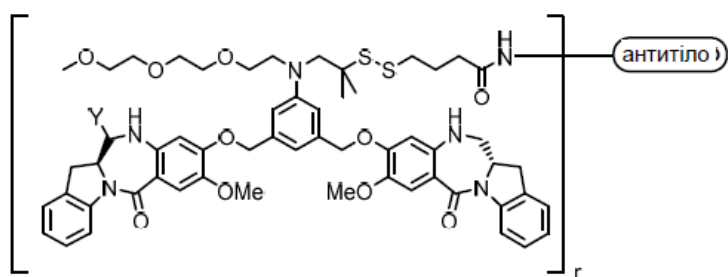


[330] Сполуки або кон'югати, отримані за допомогою способів згідно з даним винаходом, зокрема, включають:



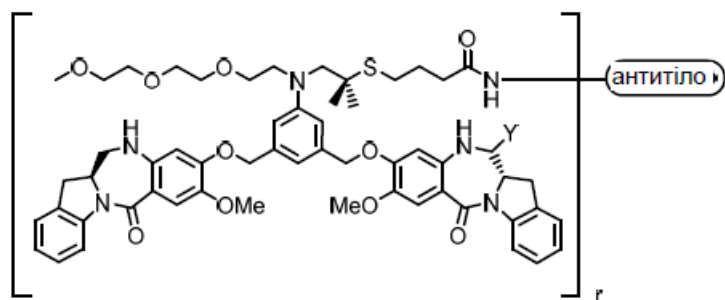
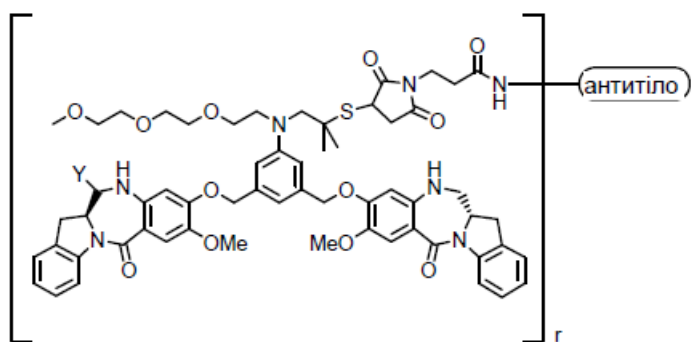
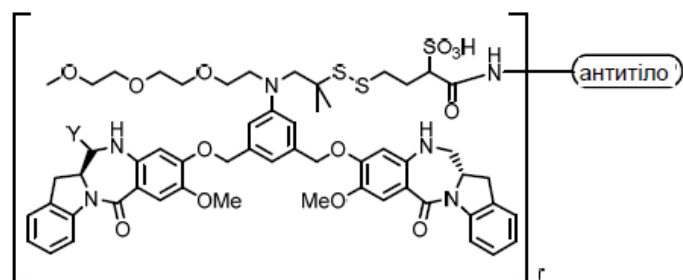
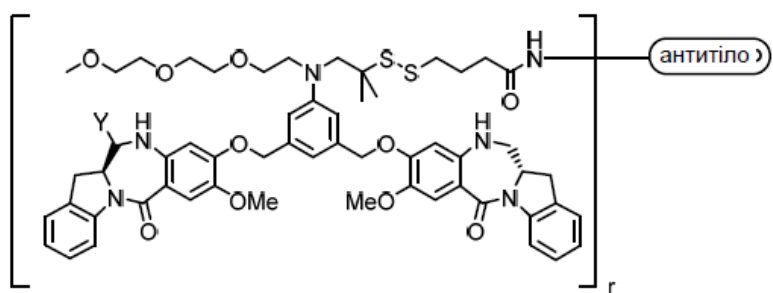




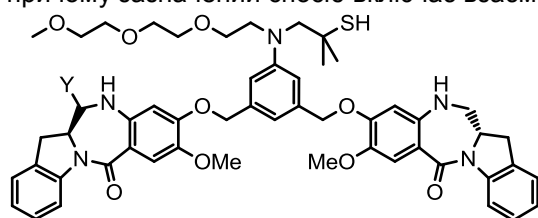


де  $r$  є цілим числом від 1 до 10,  $Y$  є -H або  $-SO_3M$ , а  $M$  є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

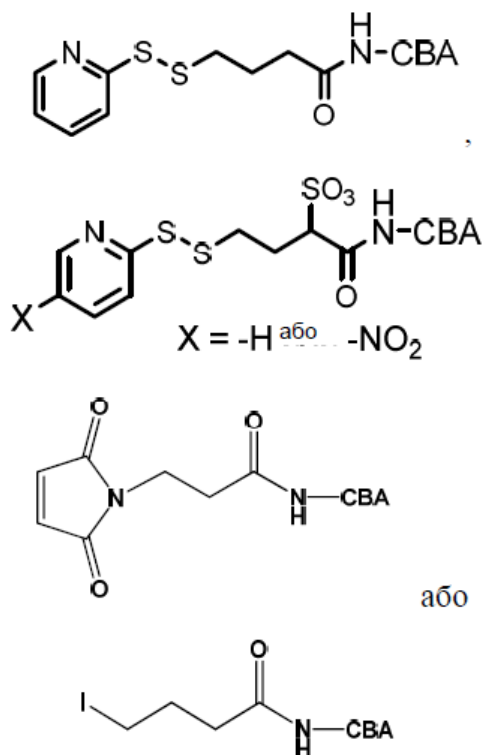
5 [331] У 25-му специфічному варіанті втілення винахід забезпечує спосіб одержання кон'югату наступної формули:



причому зазначений спосіб включає взаємодію цитотоксичної сполуки наступної формули



5 с модифікованим СВА наступної формули, відповідно, за рН від приблизно 4 до приблизно 9,



де:

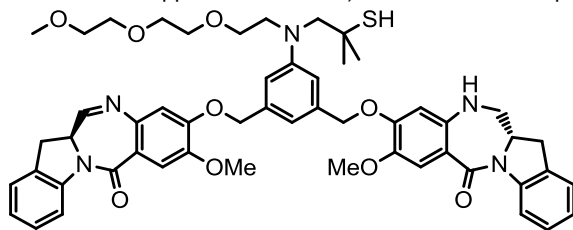
г являє собою ціле число від 1 до 10;

- 5    У являє собою групу, яка відходить, і являє собою сульфат ( $HSO_3$ ,  $HSO_2$  або сіль  $HSO_3^-$ ,  $SO_3^{2-}$  або  $HSO_2^-$ , утворену катіоном), метабісульфіт ( $H_2S_2O_5$  або сіль  $S_2O_5^{2-}$ , утворену катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагідрофосфат ( $PO_3SH_3$ ,  $PO_2S_2H_2$ ,  $POS_3H_2$ ,  $PS_4H_2$  або сіль  $PO_3S^{3-}$ ,  $PO_2S_2^{3-}$ ,  $POS_3^{3-}$  або  $PS_4^{3-}$ , утворену катіоном), складний ефір тіофосфату ( $(R^iO)_2PS(OR^i)$ ,  $R^iS-$ ,  $R^iSO$ ,  $R^iSO_2$ ,  $R^iSO_3$ , тіосульфат ( $HS_2O_3$  або сіль  $S_2O_3^{2-}$ , утворену катіоном), дитіоніт ( $HS_2O_4$  або сіль  $S_2O_4^{2-}$ , утворену катіоном), фосфородитіоат ( $P(=S)(OR^k)(S)(OH)$  або його сіль, утворену катіоном), гідроксамову кислоту ( $R^kC(=O)NOH$  або сіль, утворену катіоном), формальдегідсульфоксилат ( $HOCH_2SO_2^-$  або сіль  $HOCH_2SO_2^-$ , утворену катіоном, наприклад,  $HOCH_2SO_2^-Na^+$ ) або їх суміш, де  $R^i$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщений щонайменше одним замісником, вибраним із  $-N(R^j)_2$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SO_3H$  і  $-PO_3H$ ;  $R^i$ , необов'язково, може бути додатково заміщений замісником для алкілу, описаним тут;  $R^j$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;  $R^k$  являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил; переважно У являє собою  $-SO_3M$ ; а

М являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон.

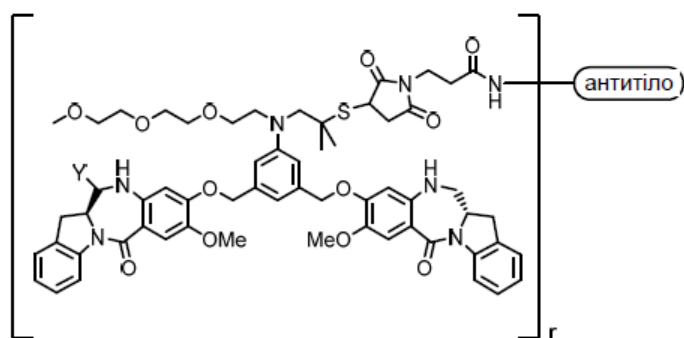
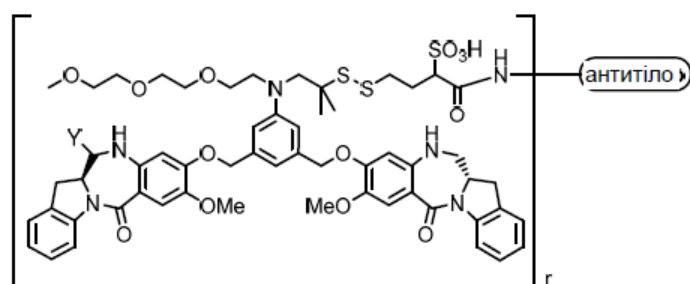
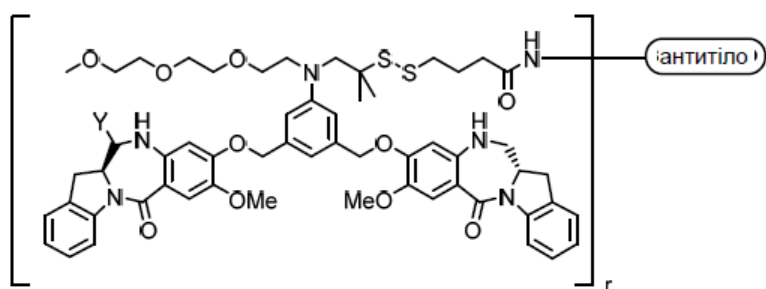
- 20    [332] У деяких варіантах втілення У є  $-SO_3M$ ; а М є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

[333] У деяких варіантах втілення цитотоксичну сполуку одержують взаємодією реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, з імін-вмісною цитотоксичною сполукою наступної формули:

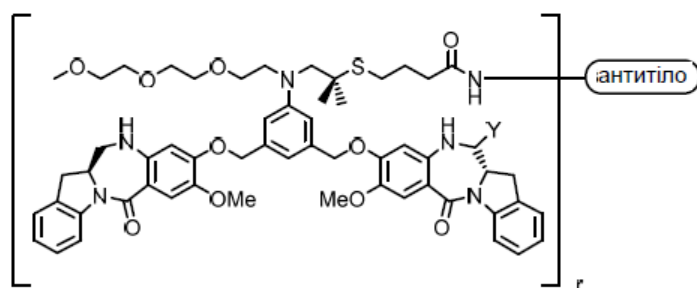


- 25    [334] У деяких варіантах втілення CBA є huMy9-6.

[335] У 26-му специфічному варіанті втілення винахід забезпечує спосіб одержання кон'югату наступної формули:



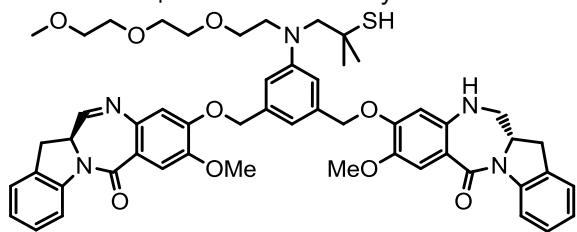
або



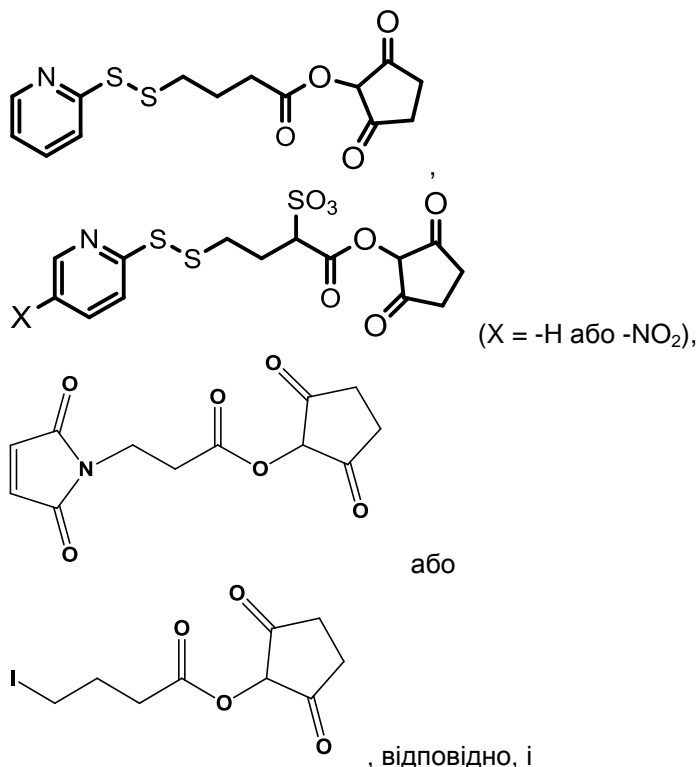
5 причому спосіб включає взаємодію СВА з імін-вмісною цитотоксичною сполукою, реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, і біфункціональним зшиваючим агентом, який містить зв'язуючу групу, з утворенням кон'югату,

де:

імін-вмісна цитотоксична сполука являє собою:



біфункціональний зшиваючий агент являє собою:



- 5 реagent, здатний взаємодіяти з імінами, вибраний із: сульфитів (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> або солі HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> або HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утвореної катіоном), метабісульфіту (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> або солі S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>, утвореної катіоном), моно-, ди-, три- і тетрагіофосфатів (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>3</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>3</sub> або солі PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> або PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>, утвореної катіоном), складних ефірів тіофосфату ((R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>SH, R<sup>i</sup>SOH, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>H, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>H), різних амінів (гідроксиламіну (наприклад, NH<sub>2</sub>OH), гідазину (наприклад, NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), NH<sub>2</sub>O-R<sup>i</sup>, R<sup>i</sup>NH-R<sup>i</sup>, NH<sub>2</sub>-R<sup>i</sup>), NH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>-C(=S)-NH<sub>2</sub>, тіосульфату (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> або солі S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, утвореної катіоном), дитіоніту (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> або солі S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, утвореної катіоном), фосфородитіоату (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(SH)(OH) або його солі, утвореної катіоном), гідроксамової кислоти (R<sup>k</sup>C(=O)NHOH або солі, утвореної катіоном), гідазиду (R<sup>k</sup>CONHNH<sub>2</sub>), формальдегідсульфоксидату (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H або солі HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, утвореної катіоном, наприклад, HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>), глікозильованого нуклеотиду (наприклад, GDP-манози), флударабіну або їх суміші, де R<sup>i</sup> і R<sup>j</sup> незалежно являють собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, і заміщені щонайменше одним замісником, вибраним із -N(R<sup>i</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H і -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> і R<sup>j</sup>, необов'язково, можуть бути додатково заміщені замісником для алкілу, описаним тут; R<sup>j</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; R<sup>k</sup> являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, гетероцикліл або гетероарил.

[336] У деяких варіантах втілення Y є -SO<sub>3</sub>M; а M є -H або фармацевтично прийнятним катіоном.

[337] У деяких варіантах втілення CBA є huMy9-6.

- 25 Цитотоксичність сполук і кон'югатів IN VITRO

- [338] Можна виконати оцінку здатності цитотоксичних сполук і кон'югатів агент, який зв'язується із клітинами/лікарська речовина, отриманих способами згідно з даним винаходом, пригнічувати проліферацію різних ліній ракових клітин in vitro. Наприклад, для оцінки цитотоксичності зазначених сполук і кон'югатів можна використовувати такі лінії клітин як лінія карциноми ободової кишки людини COLO 205, лінія клітин рабдоміосаркоми RH-30 і лінія клітин множинної мієломи MOLP-8. Клітини, використовувані для оцінки, можна піддавати впливу сполук або кон'югатів протягом 1-5 діб, а фракції клітин, які вижили, вимірювати шляхом прямого аналізу за допомогою відомих способів. Потім на підставі результатів аналізів можна розрахувати значення IC<sub>50</sub>. Як альтернативу або доповнення, як один із посібників з визначення типів раку, які можуть мати чутливість до лікування сполуками або кон'югатами, отриманими за допомогою способів згідно з винаходом, можна використовувати скринінг чутливості ліній клітин in vitro, наприклад, описаний у Національному інституті раку США (див. Voskoglou-Nomikos et al., 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239, включений у даний документ за допомогою посилання).

[339] Приклади оцінки in vitro активності і специфічності відносно мішені кон'югатів

антитіло/цитотоксичний агент, отриманих за допомогою способів згідно з даним винаходом, показані на Фіг. 17. Усі кон'югати є надзвичайно цитотоксичними відносно антиген-позитивних ракових клітин з  $IC_{50}$  у низькому діапазоні. Антиген-негативні лінії клітин залишаються життєздатними під час впливу цих же кон'югатів. Показано, що спрямована специфічна активність індолбензодіазепінових димерів знижувалася в 160 разів при блокуванні некон'югованим антитілом huMy9-6 (проти CD33) (Фіг. 17) і знижувалася в 40 разів при блокуванні некон'югованим антитілом FOLR1 (антитіло проти рецептора фолату) (результат не показаний). Наприклад, кон'югат huMy9-6-SPDB-1f, який несе адукти бісульфіту, знищував антиген-позитивні клітини HL60/QC зі значенням  $IC_{50}$ , яке дорівнює 10,5 нМ, у той час як додавання надлишку некон'югованого антитіла huMy9-6 антитіло послаблювало цитотоксичну дію ( $IC_{50} = 1,69$  нМ), демонструючи специфічність до антигена (Фіг. 17А). Крім того, кон'югат huMy9-6-SPDB-1f також має високу активність як до лінії клітин HL60/ATCC зі значенням  $IC_{50}$  21 нМ, так і до лінії клітин NB-4 зі значенням  $IC_{50}$  190 нМ (Фіг. 17Б і 17В).

[340] Дію кон'югування на зв'язування антитіл вимірювали шляхом порівняння зв'язування як некон'югованого антитіла huMy9-6, так і кон'югату huMy9-6-SPDB-1f з лінією клітин HL60/QC (Фіг. 18). FACS-аналіз виявив, що зміни зв'язуючої здатності кон'югату з вільними антитілами відсутні, що вказує на відсутність порушень зв'язування, викликаних кон'югуванням цитотоксичного агента з антитілом.

[341] В одному прикладі вимірювали активність кон'югату "агент, який зв'яже клітини/цитотоксичний агент" *in vivo*. Бестимусних мишей, які несуть пухлини HL60/QC людини, лікували кон'югатом huMy9-6-SPDB-1f і при багаторазових дозах спостерігали значний регрес пухлини, у той час як у необроблених мишей спостерігали швидкий ріст пухлини (Фіг. 19). Активність спостерігалася при дозах 20 мкг/кг, що щонайменше в 35 разів нижче, ніж максимально стерпна доза.

[342] Дія насичення іміногруп на витримку показана в Таблиці 9. Диіміновий кон'югат huFOLR1-лікарська речовина 1 випробовували при багаторазових дозах, усі з яких були визнані високотоксичними, причому, ті, що вижили залишалися тільки в групі, яка зазнала впливу мінімальних протестованих доз 50 мкг/кг. На противагу цьому виявлено, що частково відновлені моноімінові кон'югати huFOLR1-лікарська речовина 2 і huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f), мали значно поліпшену здатність до витривалості, причому кон'югат huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) демонстрував 100% виживаність тварин при максимальних протестованих дозах 560 мкг/кг.

Приклади

#### ПРИКЛАД 1

[343] Гуманізоване антитіло MY9-6 у концентрації 2 мг/мл кон'югували з 9 молярними еквівалентами 2-NHS-ефіру (сполуки 2) протягом 3 год за 25 °C в 85% PBS, pH 7,4, який містить 15% ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали на знесолювальній колонці G25 в PBS, pH 7,4, для видалення лікарської речовини, яка не прореагувала, або гідролізованої некон'югованої. Кон'югат діалізували в буфері, який складався з 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, буфер із pH 6,5, який містить 1% сахарози. На основі УФ-поглинання за 280 і 320 нм і розрахунків з використанням коефіцієнтів екстинкції лікарської речовини і антитіла за 280 нм і 320 нм визначили, яке співвідношення лікарська речовина/антитіло (DAR) у складі кон'югату склало 1,4.

[344] Кон'югат аналізували на процентний вміст мономера ексклюзійною хроматографією (SEC) на колонці TSK-Gel G300SWXL (7,8 мм x 300 мм, розмір часток 5 мкм), використовуючи ізократичну рухливу фазу - 400 мМ перхлорат натрію, 150 мМ калій-фосфатний буфер, pH 7,0, зі швидкістю 1 мл/хв. Процентний вміст мономера (% мономера) і агрегату визначали шляхом моніторингу УФ-поглинання всіх видів антитіл за 280 нм і вимірювання площі під кривою (ППК) кожного піка антитіла. Крім того, визначали процентний вміст (%) 2 лікарських речовин як у мономері, так і в агрегаті шляхом моніторингу УФ-поглинання всіх видів антитіл за 320 нм і 280 нм і вимірювання ППК кожного піка антитіла. % мономера кон'югату huMy9-6-2, який характеризувався значенням DAR 1,4, становив 91%. % 2 у мономері становив 80%.

[345] Для аналізу вільної (некон'югованої) лікарської речовини кон'югат екстрагували ацетоном для видалення білка, висушували, відновлювали в рухливій фазі і впорскували в ОФ-ВЕРХ-колонку VYDAC 208TP C8 (4,6 x 250 мм, розмір часток 7 мкм), використовуючи лінійний градієнт від 20% ацетонітрилу і 80% деіонізованої води до 100% ацетонітрилу, який містить 0,025% оцтової кислоти, зі швидкістю 1 мл/хв. протягом 48 хв., і порівнювали зі стандартами лікарська речовина - метиловий ефір. Визначили, який відсоток вільної некон'югованої лікарської речовини в кон'югаті склав < 1% від вмісту кон'югованої лікарської речовини.

[346] Кон'югат huMy9-6-2 зі співвідношенням лікарська речовина/антитіло (DAR) 1,4 аналізували за допомогою мас-спектрометрії (МС) після деглікозилювання (Фіг. 1А). На мас-

спектрограмі кон'югату показане некон'юговане антитіло (D0) у вигляді найбільшого піка, менший пік D1 (антитіло з 1 приєднаною лікарською речовиною), і значно менші піки D2 і D3 для 2 і 3 лікарських речовин, приєднаних до антитіла. Ефективність кон'югування була низкою зі значенням DAR кон'югату, яке дорівнює 1,4, після кон'югування з 9-кратним молярним надлишком 2-NHS-ефіру у порівнянні з антитілом.

#### ПРИКЛАД 2

[347] Для кон'югування 2-NHS-ефіру (сполука 2) з використанням бісульфіту натрію 2-NHS-ефір (сполука 2) попередньо інкубували з 0,9 молярного еквіваленту бісульфіту натрію (свіжоприготовлений розчин  $\text{NaHSO}_3$  у деіонізованій воді) в 66% розчині ДМА (диметилацетаміду) у воді протягом 30 хв. за температури 25 °C. Антитіло huMy9-6 у концентрації 2 мг/мл кон'югували з 9 молярними еквівалентами 2-NHS-ефіру (з доданням  $\text{NaHSO}_3$ ) протягом 3 год за 25 °C в 85% PBS, pH 7,4, який містить 15% ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали на знесолювальній колонці G25 в PBS, pH 7,4, для видалення лікарської речовини, яка не прореагувала, або гідролізованої. Кон'югат діалізували в буфері, який містив 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, 1% сахарози, pH 6,5.

[348] DAR кон'югату huMy9-6-2, отриманого з використанням бісульфіту натрію, вимірювали за допомогою УФ-спектрофотометрії за 280 і 320 нм; розраховане значення DAR склало 3,1. % мономера кон'югату склав 95%, а % 2 у мономері склав 91%. На мас-спектрограмі кон'югату, отриманого з використанням бісульфіту натрію після деглікозилювання показаний найбільший пік D1 з однією приєднаною лікарською речовиною, а також піки D2, D3, D4, D5, D6 для 2-6 лікарських речовин на антитіло (Фіг. 1Б).

[349] Кон'югат huMy9-6-2, отриманий з використанням бісульфіту натрію, демонстрував значно більший ступінь введення лікарської речовини зі значенням DAR 3,1 у порівнянні з кон'югатом, отриманим без бісульфіту натрію, який мав значення DAR 1,4. На мас-спектрограмі кон'югату зі значенням DAR 3,1, отриманого з бісульфітом натрію, показані піки кон'югату з 1-6 приєднаними лікарськими речовинами, причому найбільший пік відповідає D1 з 1 приєднаною лікарською речовиною. На противагу цьому, на мас-спектрограмі кон'югату зі значенням DAR 1,4, отриманого без бісульфіту натрію, показаний найбільш високий пік некон'югованого антитіла (D0) і значно менші піки кон'югатів із приєднаною лікарською речовиною D1, D2 і D3. Процентний вміст лікарської речовини в мономері для кон'югату huMy9-6-2, отриманого з бісульфітом натрію, склав 91%, що було вище, ніж 80% лікарської речовини в мономері для кон'югату huMy9-6-2, отриманого без бісульфіту натрію. В цілому якість кон'югату huMy9-6-2, отриманого з використанням бісульфіту натрію, таким чином, була значно вищою, ніж при традиційній процедурі кон'югування без бісульфіту натрію.

[350] Кон'югування NHS-ефірів декількох лікарських речовин (1, 2, 3 і 4) з антитілами проводили за присутності бісульфіту натрію ( $\text{NaHSO}_3$ ) і порівнювали із традиційним способом кон'югування без  $\text{NaHSO}_3$ . Результати показані в Таблиці 16. У всіх випадках додавання бісульфіту натрію при кон'югації дозволяло одержати кон'югати зі значно кращою якістю, підвищеною DAR і % лікарської речовини в мономері, ніж кон'югати, отримані без додавання бісульфіту натрію.

Таблиця 16

Порівняння кон'югування антитіл з декількома NHS-ефірами лікарських речовин без або з додаванням бісульфіту натрію ( $\text{NaHSO}_3$ )

$\text{NaHSO}_3$ додавання	Тип лікарської речовини	DAR	% мономера	% лікарської речовини в мономері
-	2	1,4	91	80
+		3,0	95	91
-	3	0,5	95	35
+		2,5	95	91
-	4	1,0	90	65
+		3,8	90	84
-	1	1,1	95	40
+		2,7	92	87

[351] Кон'югат huMy9-6-2, отриманий з бісульфітом натрію, демонстрував аналогічну цитотоксичність *in vitro* у порівнянні з кон'югатом, отриманим без бісульфіту натрію (Фіг. 2). Таким чином, з використанням бісульфіту натрію одержували кон'югат кращої якості з



підвищеним DAR і % лікарської речовини в мономері без втрати цитотоксичної активності. Кон'югат антитіло проти CD22-2, отриманий з бісульфітом натрію, демонстрував аналогічну цитотоксичність *in vitro* у порівнянні з кон'югатом, отриманим без бісульфіту натрію (Фіг. 3).

[352] Кон'югат huMy9-6-2, отриманий з використанням бісульфіту натрію, аналізували за допомогою електрофорезу у невідновлюваному ДСН-ПААГ з використанням аналізатора геля на чипі. Кон'югат продемонстрував тільки смугу інтактного антитіла; смуг важкого і легкого ланцюга не спостерігали, що вказувало на непередбачувану позитивну якість підходу, яка полягає в тому, що доданий бісульфіт натрію не викликав небажаного відновлення нативних міжланцюгових дисульфідних зв'язків у складі антитіла.

[353] 2-NHS-ефір або SPDB-NHS-ефіри 3, 4, 1 і 5 попередньо інкубували з 0,5-3 молярними еквівалентами бісульфіту натрію (свіжоприготовлений розчин  $\text{NaHSO}_3$  у деіонізованій воді) в 66-98% розчині ДМА (диметилацетаміду) у воді протягом від 15 хвилин до 4 годин за 25 °С. Деякі із зазначених реакційних розчинів також залишали на ніч за 4 °С і використовували для кон'югування через 20 год.

[354] 2-NHS-ефір у ДМА, оброблений бісульфітом натрію або без додавання бісульфіту натрію, аналізували за допомогою ВЕРХ, використовуючи обернено-фазову колонку VYDAC C8 з лінійним градієнтом від 20% ацетонітрилу і 80% деіонізованої води до 100% ацетонітрилу, який містить 0,025% оцтову кислоту, за 1 мл/хв. протягом 48 хв. Як показано на фіг. 4, вихідний 2-NHS-ефір елюювався на ~ 23 хв. Через 30 хв. обробки 0,9 молярними еквівалентами  $\text{NaHSO}_3$  в 66% розчині ДМА у воді за 25 °С більшу частину 2-NHS перетворювали на сульфовану, більш полярну, форму, яка елюювалася на ~ 14 хв. Як не дивно, небажаного піка сульфованої гідролізованої 2 не спостерігали. Таким чином, спостерігали непередбачувано сприятливу реакцію бісульфіту натрію стосовно приєднання до імінного зв'язку без реакції з NHS-ефіром.

[355] Аналогічно NHS-ефіри лікарських речовин обробляли реагентами, здатними взаємодіяти з імінами, які не являли собою бісульфіт натрію, перед кон'югуванням з антитілом. Альтернативний підхід до кон'югування полягав у обробці суміші NHS-ефіру лікарської речовини і антитіла бісульфітом натрію або іншого реагенту, здатного взаємодіяти з імінами.

#### ПРИКЛАД 3

[356] Кон'югат антитіло-SPDB-1, з'єднаний дисульфідним зв'язком, одержували з використанням синтезованого 1-SPDB-NHS-ефіру (сполуки 1с). 1-SPDB-NHS-ефір попередньо обробляли 3 молярними еквівалентами бісульфіту натрію (використовуючи свіжоприготовлений розчин  $\text{NaHSO}_3$  у воді) в 96-98% розчині ДМА у воді протягом 4-5 год за 25 °С. Розчин 1-SPDB-NHS-ефіру, обробленого бісульфітом натрію, у ДМА аналізували, використовуючи колонку VYDAC C8 для обернено-фазової ВЕРХ і лінійний градієнт 20% ацетонітрилу і 80% деіонізованої води, який містить 0,025% оцтову кислоту, за швидкості 1 мл/хв. протягом 48 хв. ОФ-ВЕРХ-аналіз продемонстрував тільки бажану реакцію приєднання бісульфіту до імінного зв'язку без небажаної реакції бісульфіту з NHS-ефіром.

[357] Для кон'югування гуманізоване антитіло в концентрації 2 мг/мл піддавали взаємодії з 5-7 молярними еквівалентами 1-SPDB-NHS-ефіру (попередньо обробленого  $\text{NaHSO}_3$ ) протягом 6 год за 25 °С в 85% водному PBS-буфері, pH 7,4, який містив 15% N,N-диметилацетамід (ДМА), а потім очищали фільтрацією через колонку G25 для гелі-фільтрації в PBS, pH 7,4, для видалення лікарської речовини, яка не прореагувала, або гідролізованої. Кон'югати гуманізоване антитіло-SPDB-1 діалізували в буфері, який містив 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, 1% сахарози, pH 6,5. Виміряне за рахунок УФ-поглинання за 280 і 320 нм із використанням коефіцієнтів екстинкції лікарської речовини і антитіла за 280 нм і 320 нм співвідношення лікарська речовина/антитіло (DAR) кон'югатів склало 2,2-2,9. Визначений за допомогою SEC (ексклюзійної хроматографії) процентний вміст мономера у препараті кон'югату склав 90%. На основі УФ-поглинання піка мономера, отриманого за допомогою SEC, також продемонстрували, що пік мономера кон'югату містив приєднані молекули лікарської речовини. За допомогою екстракції ацетоном і обернено-фазової ВЕРХ показано, що % некон'югованої лікарської речовини становив менше 1%.

[358] МС кон'югату деглікозильоване антитіло-SPDB-1, отриманого з використанням бісульфіту натрію, доданого до кон'югування, продемонструвала значно кращий кон'югат у порівнянні з кон'югатами, отриманими при кон'югуванні без бісульфіту натрію (Фіг. 5). МС кон'югату, отриманого без бісульфіту натрію, продемонструвала середнє співвідношення 1,4 1/Ab і молекули антитіл, які містили до трьох приєднаних молекул 1 (Фіг. 5А). На противагу цьому, МС кон'югату, отриманого з використанням бісульфіту натрію, продемонструвала середнє співвідношення 2,5 1/Ab і молекули антитіл, які містили до семи приєднаних молекул 1 (Фіг. 5Б).

[359] Аналіз кон'югату антитіл-SPDB-1, з'єданого дисульфідним зв'язком, отриманого з

використанням бісульфіту натрію, за допомогою електрофорезу у невідновлюваному ДСН-ПААГ з використанням аналізатора геля на чипі продемонстрував тільки смугу інтактного антитіла. Аналіз гелю на чипі проводили з використанням Agilent Protein 230 Protein Chip і аналізували за допомогою Agilent 2300 Bioanalyzer. Смуг важкого і легкого ланцюга не спостерігали, що вказувало на непередбачувану позитивну властивість підходу, яка полягає в тому, що доданий бісульфіт натрію не викликав небажаного відновлення нативних міжланцюгових дисульфідних зв'язків у складі антитіла (Фіг. 6). Наявність приєднаної лікарської речовини в кон'югаті антитіло-SPDB-1, отриманому з використанням бісульфіту натрію, також продемонструвала, що, як не дивно, дисульфідний лінкер у кон'югаті був стабільний відносно доданого бісульфіту натрію.

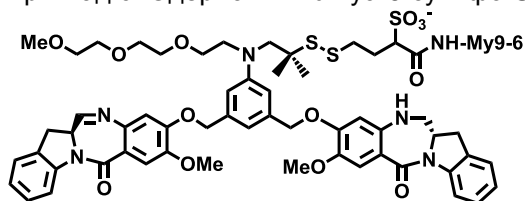
#### ПРИКЛАД 4

[360] Для одержання кон'югату 1f-SPDB-NHS-ефір (сполука 1с, Фіг. 7) попередньо інкубували з 3 молярними еквівалентами бісульфіту натрію (свіжоприготовлений розчин  $\text{NaHSO}_3$  у деіонізованій воді) в 96% розчині ДМА (диметилацетаміду) у воді протягом 5 год за 25 °С, а потім інкубували протягом ночі за 4 °С до кон'югування. Гуманізоване антитіло в концентрації 2-3 мг/мл модифікували 8 молярними еквівалентами 1f-SPDB-NHS-ефіру за відсутності або за присутності бісульфіту натрію (-/+  $\text{NaHSO}_3$ ) протягом 4 год за 25 °С у водному 95% буфері, який містив 50 мМ HEPES, pH 8,5, і 5% ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали обидва кон'югати на знесолювальній колонці G25 в PBS, pH 7,4, для видалення гідролізованої лікарської речовини, яка не прореагувала. Кон'югати діалізували в буфері, який містив 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, 1% сахарози, pH 6,5. DAR кон'югату вимірювали за допомогою УФ-спектрофотометрії за 280 і 320 нм. % мономера і % лікарської речовини на мономер у кон'югаті визначали за допомогою SEC. Некон'юговану лікарську речовину в кон'югаті визначали за допомогою обернено-фазової ВЕРХ після екстракції ацетоном. Зазначені реакції кон'югування проводили з використанням декількох гуманізованих антитіл.

#### ПРИКЛАД 5

[361] Для кон'югування лікарських речовин-тіолів з реакційноздатним дисульфідним лінкером, введеним в антитіло, гуманізоване моноклональне антитіло в концентрації 8 мг/мл модифікували 4-6 молярними еквівалентами гетеробіфункціонального лінкера SPDB протягом 1,5 год за 25 °С в 90% водному PBS-буфері, pH 7,5, з 5 % ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали на знесолювальній колонці G25 у буфері, який містив 35 мМ цитрату, 2 мМ ЕДТА, 150 мМ NaCl, pH 5,5 для видалення гідролізованого лінкера, який не прореагував. LAR (співвідношення лінкер-антитіло) вимірювали за УФ-поглинанням за 280 і 343 нм без і з додаванням 50 мМ дитіотреїтолу (для вимірювання загального вмісту антитіла і вивільнюваного SPy). SPDB-модифіковане антитіло в концентрації 2 мг/мл піддавали взаємодії з 2 молярними еквівалентами лікарської речовини-тіолу, обробленого бісульфітом натрію, на лінкер протягом 2-20 год за 25 °С в 85-90% буфері, який містив 50 мМ фосфату калію, 50 мМ NaCl, pH 7,5, а потім очищали на знесолювальній колонці G25 в PBS, pH 7,4, для видалення гідролізованої лікарської речовини, яка не прореагувала. DAR кон'югату антитіло-SPDB-лікарська речовина вимірювали за УФ-поглинанням за 280 і 320 нм, а відсоток мономера і відсоток лікарської речовини в мономері у препараті кон'югату визначали за допомогою SEC.

Приклад 6 Одержання huMy9-6-сульфо-SPDB-1 (2-етапний спосіб)



**My9-6-сульфо-SPDB-1**

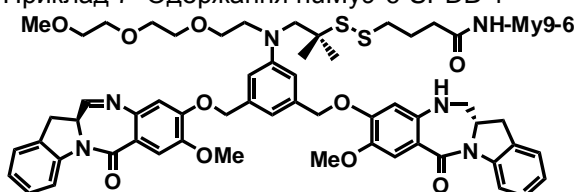
[362] Реакційну суміш, яка містила 6 мг/мл антитіла huMy9-6 і 9 молярних еквівалентів лінкера сульфо-SPDB (робочий розчин 20 мМ у ДМА), інкубували протягом 3 год за 25 °С в 50 мМ EPPS-буфері, pH 8. Лінкер, який не прореагував, видаляли за допомогою знесолювальної колонки NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare); виміряне на основі концентрації антитіла і ДТТ-вивільненої концентрації тіопіридину за допомогою спектроскопії в УФ і видимій частині спектра ( $\epsilon_{343 \text{ нм}} = 8080 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для 2-тіопіридину) співвідношення лінкер-антитіло (LAR) склало 3,7.

[363] HuMy9-6, модифіковане сульфо-SPDB, розбавляли до 2 мг/мл в 50 мМ EPPS, pH 8,5, 10% об'єм/об'єм ДМА, і піддавали взаємодії з 2 молярними еквівалентами сполуки 1d на лінкер (робочий розчин 5 мМ у ДМА, 7,4 еквівалента на антитіло) протягом 3 год за 25 °С.

[364] Після реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на розчин 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарози, 0,01% твіну-20, 50 мкМ бісульфіту натрію за рН 6,2 за допомогою знесольовальної колонки (G-25 Sephadex, fine grade, GE Healthcare).

[365] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 2,9 приєднаними молекулами сполуки 1 на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для сполуки 1 і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для антитіла MY9-6), 97,8% мономера (згідно з ексклюзивною хроматографією), < 1% некон'югованої сполуки 1 (згідно з екстракцією ацетоном/обернено-фазовою ВЕРХ), 60% виходом в розрахунку на використану кількість антитіла, і 18% загальним виходом в розрахунку на використану кількість сполуки 1d. Кон'югат, отриманий за допомогою зазначеного способу, можна було концентрувати (за допомогою обладнання на основі ювети з перемішуванням або обладнання центрифугальної фільтрації АМІКОН) до > 3 мг/мл без осадження кон'югату.

Приклад 7 Одержання huMy9-6-SPDB-1



**My9-6-SPDB-1**

Спосіб 1 (одноетапний реагентний спосіб):

[366] Реакційну суміш, яка містить 2 мг/мл антитіла huMy9-6 і 7 молярних еквівалентів 1-SPDB-NHS (попередньо обробленого 5-кратним надлишком бісульфіту натрію в суміші 90:10 ДМА:вода (об'єм/об'єм) протягом 1 год за 25 °С і потім протягом ночі за 4 °С) в 50 мМ HEPES (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота)-буфері, рН 8,5, і 10% (об'єм/об'єм) ДМА (N,N-диметилацетаміді) у якості співрозчинника інкубували протягом 3 год за 25 °С.

[367] Після реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на буфер для сполуки, яка містила 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарозу, 0,01% Твін, 50 мкМ бісульфіту натрію, за допомогою знесольовальної колонки NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Діаліз здійснювали в цьому ж буфері протягом 4 годин за кімнатної температури, використовуючи касети для діалізу Slide-a-Lyzer (Thermoscientific 20000 MWCO).

[368] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 4,0 приєднаними молекулами сполуки 1 на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для сполуки 1 і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для антитіла MY9-6), 92% мономера (згідно з ексклюзивною хроматографією, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% некон'югованої сполуки 1 (згідно з екстракцією ацетоном/обернено-фазовою ВЕРХ), 72% виходом в розрахунку на використану кількість антитіла, 40% загальним виходом в розрахунку на використану кількість 1-SPDB-NHS, і кінцевою концентрацією білка 1,0 мг/мл.

Спосіб 2 (двоетапний спосіб):

[369] Реакційну суміш, яка містила 4,8 мг/мл антитіла huMy9-6 і 6 молярних еквівалентів лінкера SPDB (робочий розчин 18,5 мМ в етанолі), інкубували протягом 3 год за 25 °С в PBS, рН 7,4. Лінкер, який не прореагував, видаляли за допомогою знесольовальної колонки NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare); виміряне на основі концентрації антитіл і ДТТ-вивільненої концентрації 2-тіопіридону за допомогою спектроскопії в УФ і видимій частині спектра ( $\epsilon_{343 \text{ нм}} = 8080 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для 2-тіопіридону) співвідношення лінкер-антитіло (LAR) склало 4,0.

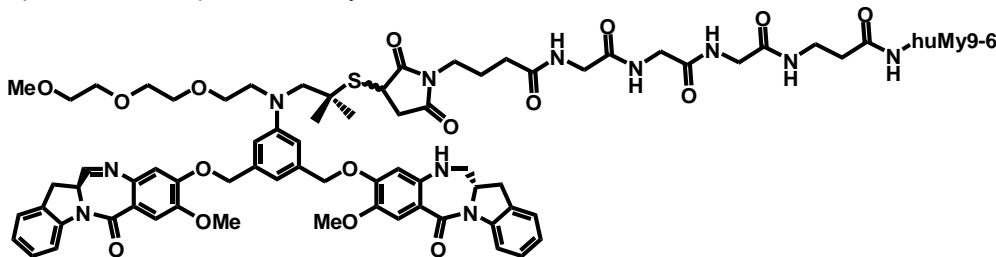
[370] HuMy9-6, модифіковане SPDB, розбавляли до 2 мг/мл в 50 мМ EPPS, рН 8,5, 10% об'єм/об'єм ДМА і піддавали взаємодії з 1,75 молярними еквівалентами сполуки 1d на лінкер (робочий розчин 5 мМ у ДМА, 7 еквівалентів на антитіло) протягом 3 год за 25 °С.

[371] Після реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на розчин 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарози, 0,01% твіну-20, 50 мкМ бісульфіту натрію за рН 6,2 за допомогою знесольовальної колонки (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare).

[372] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 3,8 приєднаними молекулами сполуки 1 на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для сполуки 1 і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для антитіла MY9-6), 91,6% мономера (згідно з ексклюзивною хроматографією, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% некон'югованої сполуки 1 (згідно з екстракцією ацетоном/обернено-фазовою ВЕРХ), 40% виходом в розрахунку на

використану кількість антитіла, 22% загальним виходом в розрахунку на використану кількість сполуки 1d і кінцевою концентрацією білка 0,5 мг/мл.

Приклад 8 Одержання huMy9-6-CX1-1-1



### huMy9-6-CX1-1-1

5 Спосіб 1 (одноетапний реагентний спосіб in situ):

[373] У розчині ДМА, який містив 1,9 мМ сполуки 1d, 1 мМ гетеробіфункціонального лінкера CX1-1 із N-гідроксисукцинімідними (NHS) і maleimідними групами та 20 мМ диізопропілетиламіну (DIPEA), проводили реакцію за кімнатної температури протягом 8 хв. Потім для нейтралізації надлишку сполуки 1d додавали 3 мМ maleimідопропіонової кислоти (MPA). Реакційну суміш 1-CX1-1-NHS зберігали в замороженому вигляді за температури -80 °C і пізніше після відтавання додавали двома порціями в забуферений розчин huMy9-6 за 25 °C (2 мг/мл, 100 мМ ЕППС, рН 8,0, 10% (об'єм/об'єм) ДМА); 4,8 молярних еквівалентів на антитіло (ґрунтуючись на концентрації лінкера), а потім, через 30 хв., 4,2 еквівалента. Після 2-годинної реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на розчин, який містив 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарози, 0,01% Твін-20, 50 мкМ бісульфіту натрію за рН 6,2, за допомогою знесольовальної колонки (Quick-spin protein, G-25 fine resin, Roche), діалізу і, нарешті, стерильної фільтрації через 0,22-мкм фільтр.

[374] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 3,3 приєднаними молекулами сполуки 1 на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для сполуки 1 і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для антитіла MY9-6), 95% мономера (згідно з ексклюзійною хроматографією, TSK3000, TOSOH Biosciences), < 1% некон'югованої сполуки 1 (згідно з екстракцією ацетоном/ обернено-фазовою ВЕРХ), 45% виходом в розрахунку на використану кількість антитіла, 17% загальним виходом в розрахунку на використану кількість сполуки 1d і кінцевою концентрацією білка 0,7 мг/мл.

Спосіб 2 (одноетапний спосіб):

[375] У забуферений розчин антитіла huMy9-6 (2 мг/мл, 50 мМ ЕППС, рН 8,5, 8% (об'єм/об'єм) ДМА) додавали 14 молярних еквівалентів сполуки 1d (5 мМ робочий розчин у ДМА), а потім 7 молярних еквівалентів лінкера CX1-1 (15 мМ розчин в етанолі) та інкубували протягом 3 год за 25 °C.

[376] Після реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на розчин, який містив 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарозу, 0,01% Твін-20, 50 мкМ бісульфіту натрію за рН 6,2, за допомогою знесольовальної колонки (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare), потім 2 × діалізом за 4 °C у касетах для діалізу Slide-a-Lyzer (Thermoscientific 20000 MWCO).

[377] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 3,4 приєднаними молекулами сполуки 1 на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для сполуки 1 і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для антитіла MY9-6), 90% мономера (згідно з ексклюзійною хроматографією, TSK3000, TOSOH Biosciences), < 1% некон'югованої сполуки 1 (згідно з екстракцією ацетоном/ обернено-фазовою ВЕРХ), 44% виходом в розрахунку на використану кількість антитіла, 11% загальним виходом в розрахунку на використану кількість сполуки 1d і кінцевою концентрацією білка 1,48 мг/мл.

Приклад 9 Мс-аналіз деглікозильованого My9-6-SPDB-1f

[378] My9-6-SPDB-1f одержували кон'югуванням сполуки 1f, яка містила NHS-ефір, безпосередньо із залишками лізину антитіла (тобто відповідно до одноетапного реагентного способу, як описано вище), або кон'югуванням сполуки 1d з антитілом, модифікованим дитіопіридином (тобто згідно із двоетапним способом, як описано вище). Потім проводили мас-спектрометричний (МС) аналіз деглікозильованого My9-6-SPDB-1f, як зазначено вище.

[379] Одноетапний реагентний спосіб дозволяв одержати кон'югат з 0-9 модифікаціями сполуки 1f, асиметричним розподілом кон'югованої лікарської речовини і значною кількістю некон'югованого антитіла. З іншого боку, кон'югат, отриманий згідно із двоетапним способом,

характеризувався МС-профілем з 0-6 модифікаціями сполуки 1f, симетричним розподілом кон'югованої лікарської речовини і дуже малою кількістю некон'югованого антитіла. Див. Фіг. 12. Обидва кон'югати мали аналогічне середнє співвідношення сполука 1f/антитіло, яке становило ~ 4 згідно зі спектрометричним аналізом в УФ і видимій частині спектра.

#### 5 Приклад 10 Дія рН на двоетапний синтез Му9-6-сульфо-SPDB-1

[380] Дані МС для Му9-6-сульфо-SPDB-1f, отриманого за допомогою двоетапного способу за різних рН, показані на Фіг. 13. Коротко, Му9-6-сульфо-SPDB (3,7 лінкера/антитіло) піддавали взаємодії з 3 еквівалентами сполуки 1d на лінкер (або приблизно 11,1 еквівалентами на антитіло) протягом 18 год за рН 6, 7, 8 і 8,5. Дані МС продемонстрували зменшення кількості лінкера, який не прореагував (супутні піки 260 а.е.м.), при зростанні рН реакційної суміші. Таким чином, виявилось, що рН впливає на реакцію кон'югування при синтезі кон'югату Му9-6-сульфо-SPDB-1f. Зокрема, для повної взаємодії сполуки 1d з лінкером сульфо-SPDB, приєднаним до антитіла, потрібно рН > 8.

#### 15 Приклад 11 Дія співвідношення сполука/лінкер на двоетапний синтез chKTI-сульфо-SPDB-1

[381] На Фіг. 14 показані дані МС для chKTI-сульфо-SPDB-1, отриманого при використанні двоетапного способу з різними співвідношеннями сполука 1d/лінкер. chKTI-сульфо-SPDB (3,7 лінкера/антитіло) взаємодіяв з 1,1, 1,3, 1,5 або 2 еквівалентами сполуки 1d на лінкер протягом 3 год за 25 °С, рН 8,5. МС продемонструвала зменшення кількості лінкера, який не прореагував (супутні піки 260 а.е.м), при зростанні еквівалентної кількості сполуки 1d на лінкер. Виявилось, що за цих умов для повної взаємодії з лінкером сульфо-SPDB, приєднаним до антитіла, потрібне співвідношення сполука 1d/лінкер > 1,3. Збільшення еквівалентної кількості сполуки 1d більше 1,5 на лінкер призвело до збільшення фрагментації антитілу (14-19%), у той час як 1,1-1,3 молекули сполуки 1d/лінкера не викликали значної фрагментації антитілу.

#### 20 ПРИКЛАД 12 Одержання кон'югату антитіло-SPDB-лікарська речовина

[382] Сполуку 1с попередньо обробляли 3 молярними еквівалентами бісульфіту натрію (використовуючи свіжоприготовлений розчин  $\text{NaHSO}_3$  у воді) в 96-98% розчині ДМА у воді протягом 4-5 год за 25 °С. Для кон'югування гуманізоване антитіло в концентрації 2 мг/мл піддавали взаємодії з 5-7 молярними еквівалентами сполуки 1с (попередньо обробленої  $\text{NaHSO}_3$ ) протягом 6 год за 25 °С в 85-90% водному PBS-буфері, рН 7,4, або 50 мМ водному Нерес-буфері, рН 8,5, який містив 10-15% N,N-диметилацетаміду (ДМА), а потім очищали фільтрацією через колонку G25 для гель-фільтрації в PBS, рН 7,4, для видалення лікарської сполуки, яка не прореагувала, або гідролізованої. Кон'югати гуманізоване антитіло-SPDB-лікарська речовина діалізували в буфері, який містив 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, 1% сахарози, рН 6,5. Виміряне за рахунок УФ-поглинання за 280 і 320 нм із використанням коефіцієнтів екстинкції лікарської речовини та антитіла за 280 нм ( $215000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) і 320 нм ( $9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) співвідношення лікарська речовина/антитіло (DAR) кон'югатів складало 2,2-2,9. Визначений за допомогою SEC (ексклюзійної хроматографії) при використанні колонки TSK-Gel G300SWXL (7,8 мм × 300 мм, розмір часток 5 мкм) процентний вміст мономера в кон'югатах склав > 90%. На основі УФ-поглинання піка мономера, отриманого за допомогою SEC, також продемонстрували, що піки мономера кон'югату містили приєднані молекули лікарської речовини. Для аналізу вільної (некон'югованої) лікарської речовини кон'югат екстрагували ацетоном для видалення білка, висушували, відновлювали в рухливій фазі, впорскували в ОФ-ВЕРХ-колонку VYDAC 208TP C8 (4,6×250 мм, розмір часток 7 мкм), і порівнювали зі стандартами. Визначили, що відсоток вільної лікарської сполуки в кон'югаті склав < 0,5% від вмісту кон'югованої лікарської сполуки.

#### 45 Одержання кон'югату гуманізоване антитіло-SPDB-2a:

[383] Гуманізоване антитіло в концентрації 8 мг/мл модифікували 4-6 молярними еквівалентами гетеробіфункціонального лінкера SPDB протягом 1,5 год за 25 °С в 95% PBS, рН 7,4, який містить 5% ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали на знесолювальній колонці G25 у цитратному буфері (35 мМ цитратний буфер, рН 5,5, який містить 2 мМ ЕДТА, 150 мМ NaCl) для видалення лінкера, який не прореагував. LAR (співвідношення лінкер-антитіло), яке визначається шляхом вимірювання УФ-поглинання за 280 і 343 нм без і з додаванням 50 мМ дитіотреїтолу (для вимірювання загального вмісту антитіла і дитіотреїтол-вивільнюваного SPу), складало 2,7-4,1. SPDB-модифіковане антитіло в концентрації 2 мг/мл піддавали взаємодії з 2 молярними еквівалентами сполуки 2a (солі HCl) на приєднаний SPDB протягом 20 год за кімнатної температури в 85% цитратному буфері, 15 % ДМА (об'єм/об'єм), а потім очищали на знесолювальній колонці G25 в PBS, рН 7,4, для видалення некон'югованої лікарської сполуки. DAR кінцевого кон'югату гуманізоване антитіло-SPDB-2a вимірювали за допомогою УФ-спектрофотометрії за 280 і 350 нм; розраховане значення DAR складало ~ 1,7-2,1. Процентний вміст мономера і приєднаної лікарської сполуки на мономер у кон'югаті визначали за допомогою

ВЕРХ, використовуючи колонку для SEC (ексклюзійною хроматографією). Див. Фіг. 16.

Приклад 13 Використання ковалентних імінових реагентів для поліпшення характеристик кон'югату антитіло/лікарська речовина (% мономера і лікарського навантаження).

5 [384] Утворення адукту проводили з використанням 5 молярних еквівалентів імінного реагенту відносно NHS-BMPS-1 в 90% ДМСО/10% PBS, рН 7,4, протягом 4 годин за 25 °С. Потім реакційну суміш додавали до антитіла huMy9-6 (4 молярних еквівалента лікарської речовини, 2 мг/мл, 10% об'єм/об'єм ДМСО, 50 мМ Hepes-буфера, рН 8,5, 5 год, 25 °С). Кон'югати, отримані з використанням гідросульфиту натрію, бісульфіту натрію або метабісульфіту натрію мали аналогічне співвідношення лікарська речовина/антитіло і процентний вміст мономера, у той час як кон'югати, отримані без обробки допоміжною добавкою, мали вкрай низький рівень вбудовування лікарської речовини.

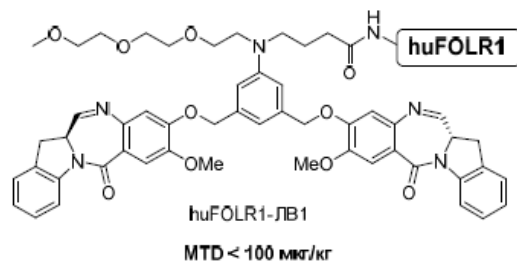
Приклад 14 Дослідження здатності до витривалості кон'югатів huFOLR-1 in vivo

15 [385] Здатність до витривалості кон'югатів huFOLR-1 in vivo досліджували на самках мишей CD-1. За тваринами спостерігали протягом семи днів до початку дослідження і визнали здоровими. Мишам вводили однократну в/в ін'єкцію бісульфіт-несучого кон'югату і щодня відслідковували у тварин втрату маси тіла, захворюваність або смертність. У Таблиці 9 показано, що кон'югат huFOLR 1-лікарська речовина 1 переносився тільки в мінімальній протестованій дозі 50 мкг/кг. На противагу цьому виявлено, що обидва моноімінні кон'югати huFOLR 1-лікарська речовина 2 і huFOLR1-SPDB-1F переносилися краще при максимальній стерпній дозі < 198 мкг/кг і > 560 мкг/кг, відповідно.

20 Таблиця 9. Дані щодо порівняння здатності до витривалості кон'югатів (А) huFOLR1-лікарська речовина 1, (Б) huFOLR 1-лікарська речовина 2 і (В) huFOLR1-SPDB-1F.

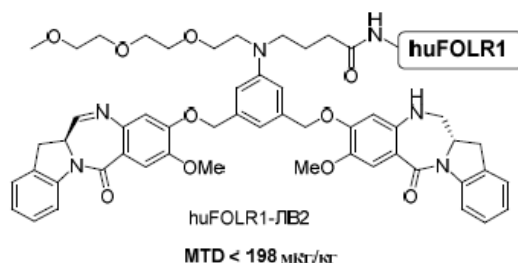
A)

Доза (мкг/кг)	% Виживаність
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0



Б)

Доза (мкг/кг)	% Виживаність
66	100
132	100
198	50
264	25



В)

Доза (мкг/кг)	% Виживаність
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



Приклад 15 Вплив пропіленгліколю на утворення сполуки та кон'югування

5 [386] У даному прикладі продемонстровано, що при досліджуваних реакціях кон'югування, проведених за присутності пропіленгліколю в якості співрозчинника, не спостерігалось осадження кон'югатів, і що 40% (і можливо навіть більш концентрований) пропіленгліколь можна використовувати без зниження % мономера в отриманому кон'югаті (за присутності 2% диметилацетаміду - дані не показані).

10 [387] Більше того, присутність пропіленгліколю під час очищення приводить до значного збільшення виходу (Таблиця 10).

[388] Не обмежуючись рамками якої-небудь конкретної теорії, автори даної заявки вважають, що одним з основних джерел проблем при кон'югуванні розглянутих кон'югатів є гідрофобність, властива молекулярним компонентам кон'югатів. Це може, щонайменше

частково, пояснити низький вихід очищеного продукту, і в ряді випадків, аномальні профілі розподілу маси, спостережувані при розглянутих реакціях кон'югування.

[389] Варто також відзначити, що додавання ізопропанолу при ексклюзійній хроматографії розглянутих кон'югатів сильно зменшує уявну кількість агрегатів. Це спостереження показує, що низькомолекулярні гідрофобні розчинники можуть підвищити розчинність лікарської речовини і кон'югату згідно з винаходом.

[390] Таким чином, розглянуті реакції кон'югування, етапи очищення після реакції, і/або формування сполуки утворених кон'югатів переважно здійснювали за присутності низькомолекулярних гідрофобних розчинників, наприклад, пропіленгліколю (наприклад, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45%).

[391] Антитіло-сульфо-SPDB одержували відповідно до раніше описаних способів шляхом додавання N-гідроксисукцинімідилової (NHS) складноефірної форми сульфо-SPDB до антитіла (huMy9-6) у воді, яка містить 3% ДМА і забуферена за pH 8,5 протягом 3 годин. Отриману проміжну сполуку (антитіло-сульфо-SPDB) очищали на G25 Sephadex з метою видалення надлишку лінкера. Кількість антитіла і лінкера оцінювали спектроскопією в УФ-видимій області спектра шляхом вимірювання оптичної щільності за 280 нм за відсутності відновника, а також за 343 нм за присутності ~ 50 мМ ДТТ для вимірювання вивільнення 2-тіопіридину з кон'югованого лінкера.

[392] З метою кон'югування лікарської речовини антитіло-сульфо-SPDB, отримане вище, піддавали взаємодії при 2 мг/мл антитіла з 2-кратним молярним надлишком сполуки 1d за присутності зазначених співрозчинників і за pH, підтримуваному на рівні 8,5 за допомогою EPPS-буфера (кінцева концентрація 60 мМ). Диметилацетамід (SAFC) і пропіленгліколь (Alfa Aesar) використовували в тому вигляді, як вони були отримані, без додаткового очищення. Усі буферні розчини стерилізували пропусканням через 0,22-мікронний фільтр (Corning), а воду очищали за допомогою зворотного осмосу/деіонізації. Реакційні суміші інкубували за 25°C протягом 3 год, а потім очищали, використовуючи одноразову колонку G25 Sephadex (Nar 25, GE Healthcare) у буфері для сполуки, яка складалася з 10 мМ гістидину, 250 мМ гліцину, 1% сахарози, 0,01% полісорбату 20, 50 мкМ бісульфіту натрію і забуференого за pH 6,2, а також зазначеного процентного вмісту пропіленгліколю (об'єм/об'єм).

[393] Вихід реакції і лікарське навантаження визначали за допомогою спектроскопії поглинання. Усі зразки демонстрували > 96% мономера відповідно до аналітичної ексклюзійної хроматографії.

[394] У Таблиці 10, наведеній нижче, показаний % виходу кон'югування залежно від вмісту пропіленгліколю в реакційній суміші або сполучі. Антитіло-сульфо-SPDB-1 одержували взаємодією сполуки 1d з антитіло-сульфо-SPDB протягом 4 годин за pH 8,5 (неводні компоненти відповідають зазначеному) з наступним очищенням на G25 Sephadex.

Таблиця 10

		Сполука	
		усі водні компоненти	15% пропіленгліколю
Реакційна суміш	0% пропіленгліколю + 10% ДМА	59	79
	30% пропіленгліколю + 2% ДМА	53*	83

\* Густий білий осад спостерігали у верхній частині колонки із сефадексом після очищення

ПРИКЛАД 16 Одержання huMy9-6-сульфо-SPDB-1d з використанням високоактивного лінкера 4-нітроПу-сульфо-SPD

[395] Реакційну суміш, яка містила 6 мг/мл антитіла huMy9-6 і 5 молярних еквівалентів високоактивного лінкера N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату (20 мМ робочий розчин в етанолі), інкубували протягом 3 год за 25 °C в 50 мМ EPPS-буфері за pH 8. Лінкер, який не прореагував, видаляли за допомогою знесолювальної колонки NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Виміряне на основі концентрації антитілу і ДТТ-вивільненої концентрації нітропіридин-2-тіону за допомогою спектроскопії в УФ і видимій частині спектра ( $\epsilon_{394 \text{ нм}} = 14205 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  для 2-тіо-4-нітропіридину) співвідношення лінкер-антитіло (LAR) склало приблизно 2,3.



[396] HuMy9-6, модифіковане лінкером, розбавляли до 2 мг/мл в 50 мМ HEPES -буфері за pH 8,5, 10% об'єм/об'єм ДМА, і піддавали взаємодії з 2 молярними еквівалентами сполуки 1d на лінкер (робочий розчин 5 мМ у ДМА, 4,6 еквівалента на антитіло) протягом 30 хв. за 25 °С. Завершення реакції обміну дисульфідних зв'язків визначали, відслідковуючи збільшення оптичної щільності за 394 нм за допомогою УФ-спектроскопії. Після реакції кон'югат очищали і замінювали буфер на розчин 250 мМ гліцину, 10 мМ гістидину, 1% сахарози, 0,01% твіну-20, 50 мкМ бісульфіту натрію за pH 6,2 за допомогою знесолювальної колонки (G-25 Sephadex, fine grade, GE Healthcare).

[397] Виявлено, що очищений кон'югат характеризувався в середньому 2,1 приєднаними молекулами 1d на антитіло (згідно зі спектроскопією в УФ і видимій частині спектра з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції  $\epsilon_{330 \text{ нм}} = 15484 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 30115 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для 1d і  $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 207000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  для huMy9-6), 98% мономера (згідно з ексклюзійною хроматографією), < 1% некон'югованого 1d (згідно з екстракцією ацетоном/ обернено-фазовою ВЕРХ), 70% виходом білка і 32% загальним виходом 1d. Див. Фіг. 28.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> IMMUNOGEN, INC.

<120> СПОСОБИ ОТРИМАННЯ КОН'ЮГАТІВ

<130> 121162-00320

<140>

<141>

<150> 61/483,499

<151> 2011-05-06

<150> 61/443,062

<151> 2011-02-15

<150> 61/443,092

<151> 2011-02-15

<160> 14

<170> Патентна версія 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний пептид

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний пептид

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)..(14)

<223> Lys, Gln, His or Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Gln, His, Asn or Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Gly, Glu, Thr, Ser, Ala or Val

<400> 2  
 Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa  
 1 5 10 15

Xaa

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
 пептид

<400> 3  
 Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr  
 1 5

<210> 4  
 <211> 15  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
 пептид

<400> 4  
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
 пептид

<400> 5  
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
 пептид

```

<400> 6
Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1          5

<210> 7
<211> 17
<212> білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності : синтетичний
        пептид

<400> 7
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1          5          10          15

Gly

<210> 8
<211> 448
<212> білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності : синтетичний
        поліпептид

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
        20          25          30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
        35          40          45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
        50          55          60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65          70          75          80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
        85          90          95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        100          105          110

```

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 9

<211> 218

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
поліпептид

<400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 10

<211> 218

<212> білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
поліпептид

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 11

<211> 118

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
поліпептид

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45



Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His  
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 12

<211> 112

<212> білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності : синтетичний  
поліпептид

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

<210> 13

<211> 112

<212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний поліпептид

<400> 13  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

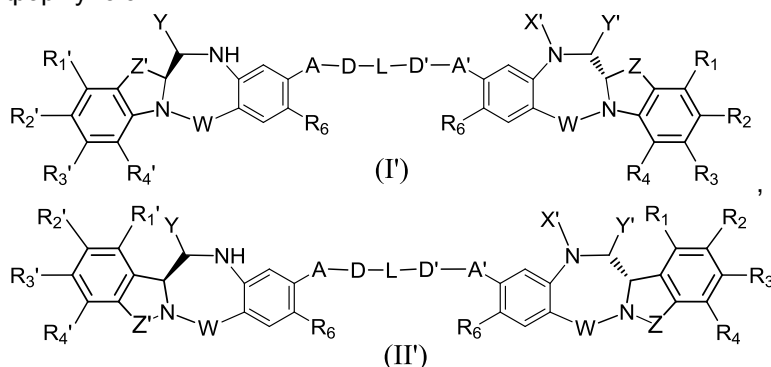
<210> 14  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності : синтетичний пептид

<400> 14  
 Ala Leu Ala Leu  
 1

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб одержання кон'югата, який включає агент, який зв'язується із клітинами (СВА), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з модифікованим СВА за рН приблизно від 4 до 9, причому:
- а) модифікований СВА включає залишок біфункціонального зшиваючого агента, зв'язаний з СВА, а зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну взаємодіяти з тіолом; і
- 10 б) модифікована цитотоксична сполука включає тіолову групу і представлена наступною формулою:



- 15 або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:  
 Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ,  
 M являє собою H або фармацевтично прийнятний катіон;

X' вибрана із -H, амінблокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або

5 більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

Y' вибрана із -H, оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке

10 містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

$R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має

15 від 1 до 4 атомів вуглецю;

кожна із  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду,

20 представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, сульфонаміду, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, в будь-якому випадку незалежно, вибраний з групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1

25 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1

30 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub> або галоген;

Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-$

40  $(CH_2)_{na'}$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ ;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них незалежно вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

45 R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;

A і A' є однаковими або різними і незалежно вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в будь-якому випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або

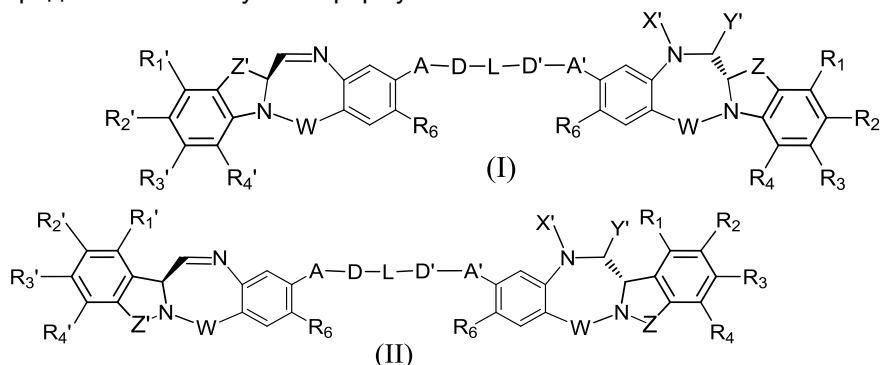
50 розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;

L відсутня або, якщо присутня, включає тілову групу і являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є, необов'язково,

60 заміщеним.

2. Спосіб згідно з п. 1, який **відрізняється** тим, що модифіковану цитотоксичну сполуку одержують взаємодією імінвмісної цитотоксичної сполуки, яка несе тіолову групу, що представлена наступною формулою:



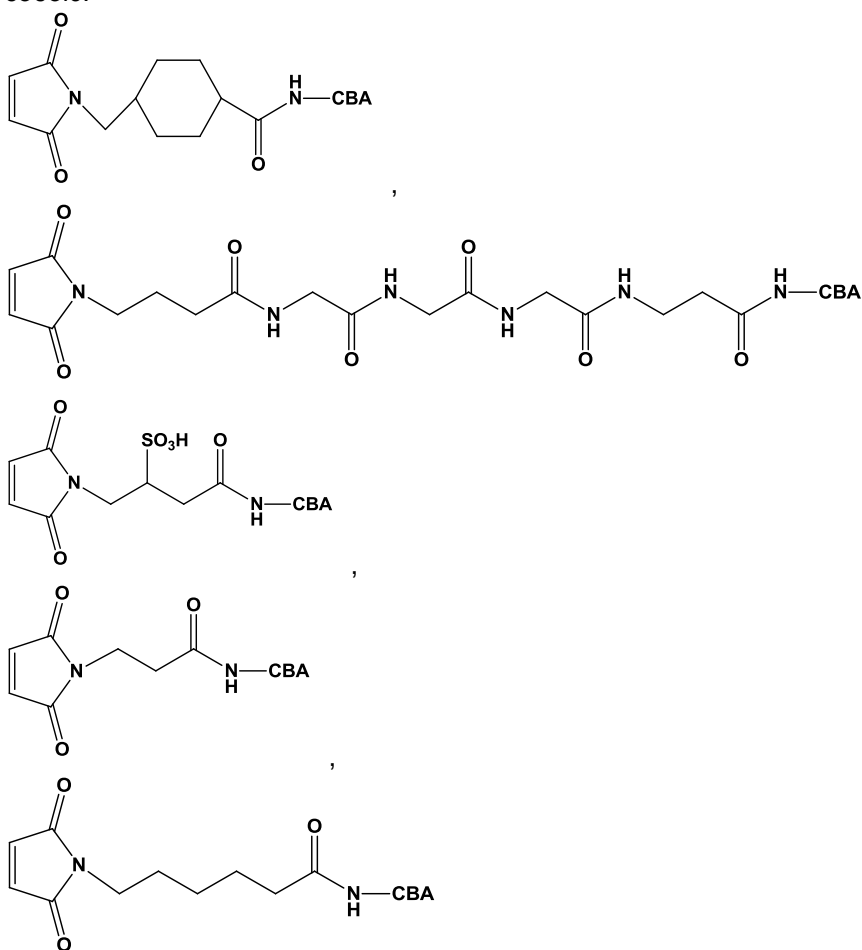
або її фармацевтично прийнятною сіллю, з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, що вибраний із групи, яка складається із сульфіту, метабісульфіту та дитіоніту.

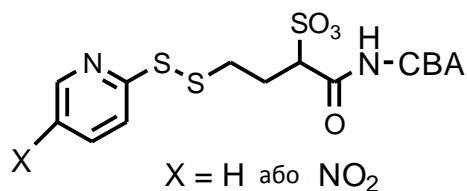
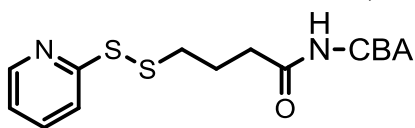
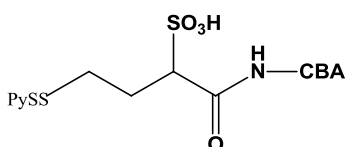
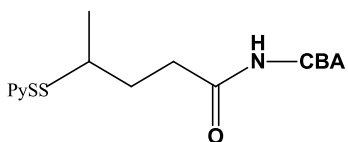
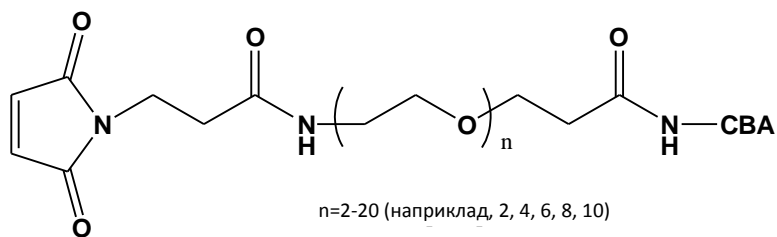
3. Спосіб згідно з п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що додатково включає очищення цитотоксичної сполуки до взаємодії з модифікованим СВА.

4. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що група, здатна взаємодіяти з тіолами, вибрана із групи, яка складається з малеїмідом, вінілпіридину, вінілсульфону, вінілсульфонамідом, групи на основі галоацетилю і дисульфідної групи.

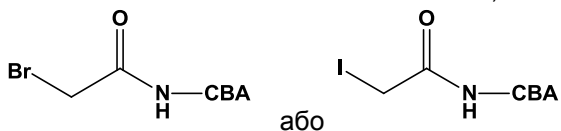
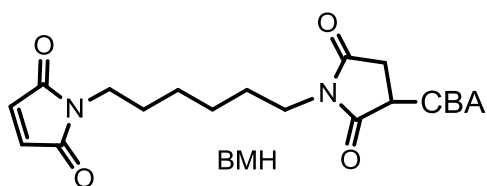
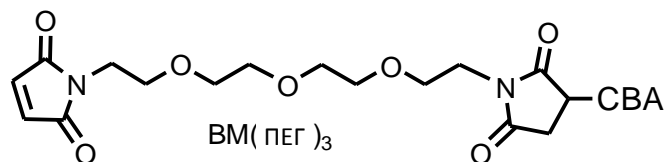
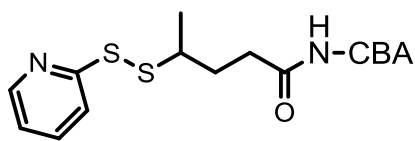
5. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що група, здатна взаємодіяти з тіолами, являє собою малеїмідом, галоацетамідом або -SSR<sup>d</sup>, де R<sup>d</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, феніл, нітрофеніл, динітрофеніл, карбоксинітрофеніл, піридил, 2-нітропіридил, 4-нітропіридил або 3-карбокси-4-нітропіридил.

6. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що модифікований СВА являє собою:



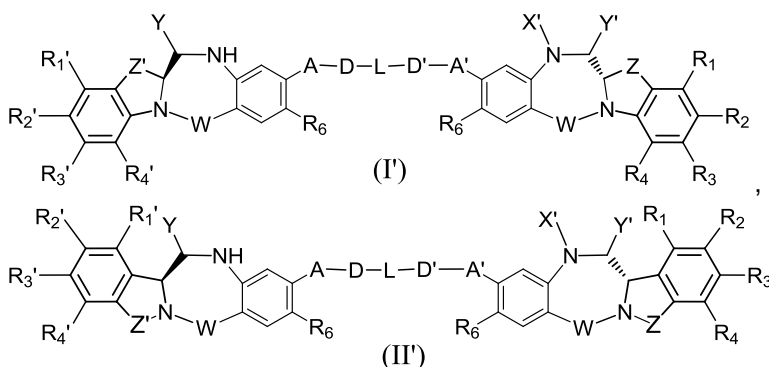


5



10

7. Спосіб одержання кон'югата, який включає агент, який зв'язується із клітинами (CBA), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, причому зазначений спосіб включає взаємодію CBA з імінвмісною цитотоксичною сполукою, що представлена наступною формулою або її фармацевтично прийнятною сіллю:



реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, що вибраний із сульфїту, метабісульфїту та дитїонїту, і біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, з утворенням кон'югата.

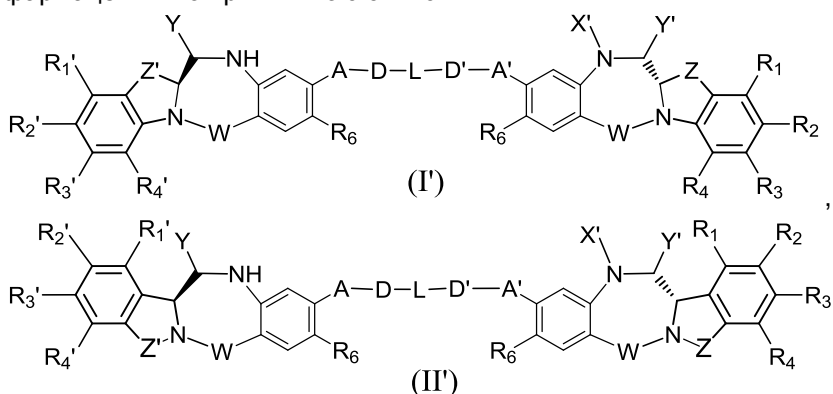
8. Спосіб згідно з п. 7, який **відрізняється** тим, що СВА приводять у контакт із імінвмісною цитотоксичною сполукою і реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, з утворенням першої суміші; а потім першу суміш приводять у контакт із біфункціональним зшиваючим агентом з утворенням кон'югата.

9. Спосіб згідно з п. 8, який **відрізняється** тим, що біфункціональний зшиваючий агент приводять у контакт із першою сумішшю безпосередньо після утворення першої суміші.

10. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 7-9, який **відрізняється** тим, що додатково включає очищення кон'югата.

11. Спосіб одержання кон'югата, який включає агент, який зв'язується із клітинами (СВА), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, спосіб, який включає:

а) взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, групу, яка реагує з СВА, і групу, здатну взаємодіяти з модифікованою цитотоксичною сполукою з утворенням другої модифікованої цитотоксичної сполуки, ковалентно зв'язаної із залишком біфункціонального зшиваючого агента, причому зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну реагувати з СВА; причому модифікована цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



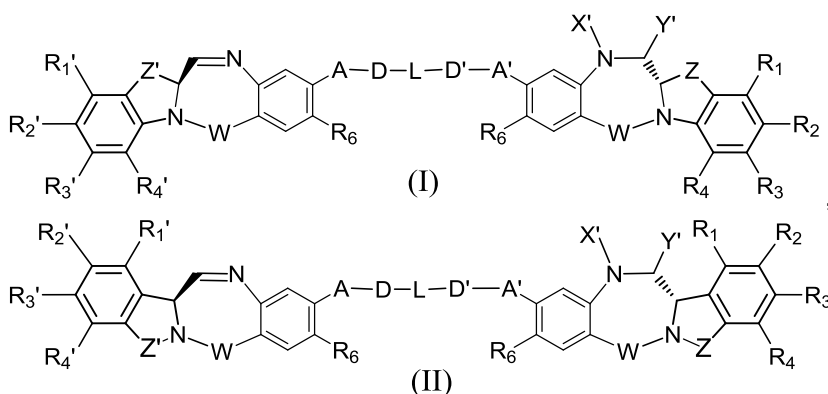
де:

$Y$  являє собою  $-SO_3M$ ;

$X'$  вибрана із  $-H$ , аміноблокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетилєнглїколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклїчного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із  $O$ ,  $S$ ,  $N$  і  $P$ ;

$Y'$  вибрана із  $-H$ , оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенїлу або алкінїлу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклїчного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

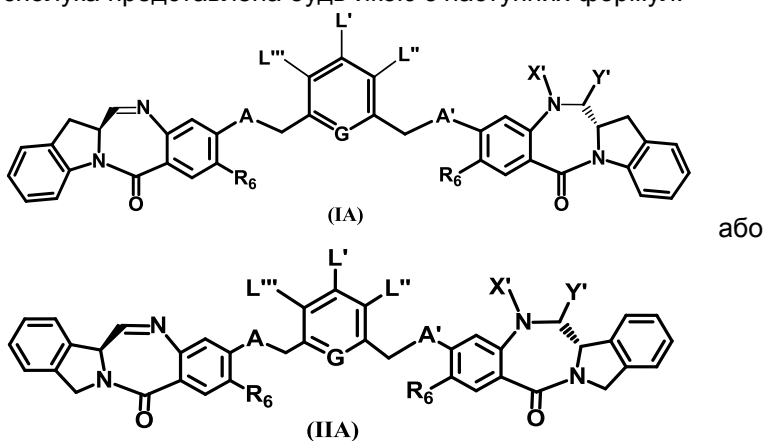
- $R^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;  
кожна із  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_3'$  і  $R_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, сульфонамідів, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';
- $R$ , в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;  
кожна із  $R'$  і  $R''$ , незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;  
 $n$  являє собою ціле число від 1 до 24;  
 $W$  вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;  
 $R_6$  являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub> або галоген;
- $Z$  і  $Z'$ , незалежно, вибрані із  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$  і  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ ;  
 $n'$  і  $na'$  є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;  
 $R_7$  і  $R_8$  є однаковими або різними, і кожна із них незалежно вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;  
 $R_9$ , незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;
- $A$  і  $A'$  є однаковими або різними і незалежно вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;
- $R_5$ , в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;  
 $D$  і  $D'$  є однаковими або різними і незалежно відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;
- $L$  відсутня або, якщо присутня, включає тілову групу або являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є, необов'язково, заміщеним; і
- б) взаємодію другої модифікованої цитотоксичної сполуки з СВА за допомогою групи, здатної взаємодіяти з СВА, за рН від приблизно 4 до приблизно 9, з утворенням кон'югата.
12. Спосіб згідно з п. 11, який **відрізняється** тим, що група, здатна взаємодіяти з СВА, є тіловою групою, малеїмідною групою, галоацетамідною групою або аміногрупою.
13. Спосіб згідно з п. 11, який **відрізняється** тим, що модифікована цитотоксична сполука включає тілову групу, а група, здатна взаємодіяти з модифікованою цитотоксичною сполукою, є групою, здатною взаємодіяти з тілами.
14. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 11-13, який **відрізняється** тим, що модифіковану цитотоксичну сполуку утримують за рахунок взаємодії імінвмісної цитотоксичної сполуки, яка несе тілову групу наступної формули, з реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, вибраним із сульфїту, метабісульфїту та дитіонїту, у реакційній суміші



15. Спосіб згідно з п. 14, який **відрізняється** тим, що додатково включає очищення модифікованої цитотоксичної сполуки до етапу а).

5 16. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 11-15, який **відрізняється** тим, що додатково включає очищення другої модифікованої цитотоксичної сполуки до етапу б).

17. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-16, який **відрізняється** тим, що імінвмісна цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



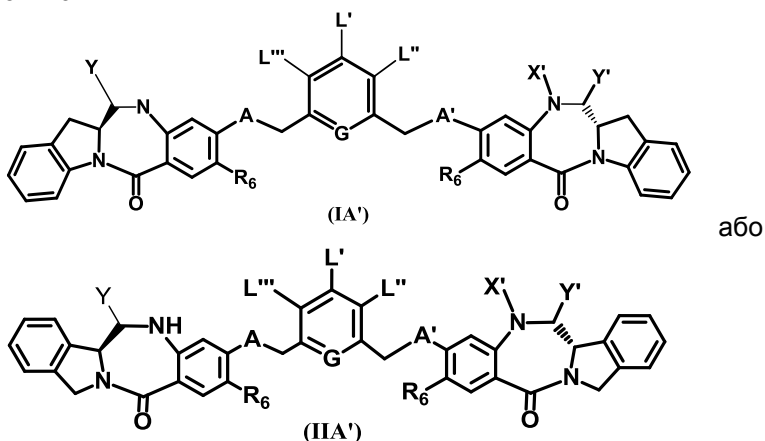
де:

L', L'' і L''' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетилєнгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M, сульфату -OSO<sub>3</sub>M, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

15 M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон; а

G вибрана із -CH- або -N-.

20 18. Спосіб згідно з п. 17, який **відрізняється** тим, що модифікована цитотоксична сполука, за її присутності, представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



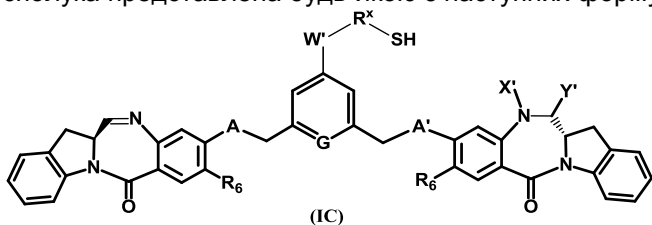


19. Спосіб згідно з п. 17 або 18, який **відрізняється** тим, що одна з L', L'' або L''' несе тіолову групу, а інші являють собою -H.

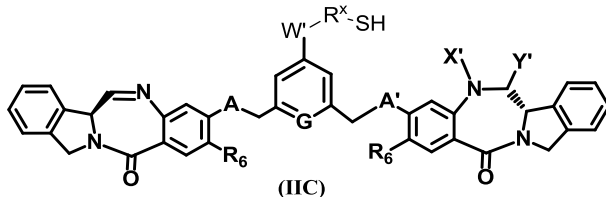
20. Спосіб згідно з п. 19, який **відрізняється** тим, що L' несе тіолову групу, а L'' і L''' являють собою -H.

5 21. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-20, який **відрізняється** тим, що як A, так і A' являє собою -O-; R<sub>6</sub> являє собою -OMe; а G являє собою -CH-.

22. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-21, який **відрізняється** тим, що імінвмісна цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або



10

або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

W' відсутня або, якщо присутня, вибрана із -CR<sup>e</sup>R<sup>e'</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -SS- або -C(=O)-, або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

15

R<sup>x</sup> відсутня або, якщо присутня, являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

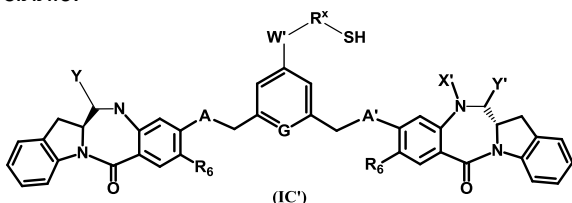
20

R<sup>e</sup> і R<sup>e'</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад, -NHR<sup>101</sup>) або третинну аміногрупу (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>), або 5- або 6-членний азотвмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю; n являє собою ціле число від 1 до 24.

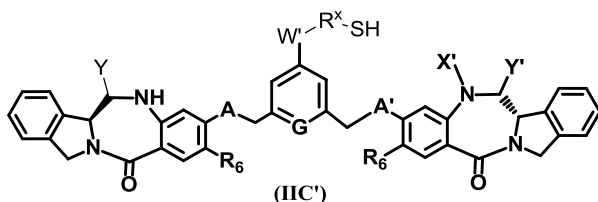
25

30

23. Спосіб згідно з п. 22, який **відрізняється** тим, що модифікована цитотоксична сполука, за її присутності, представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



або



35

24. Спосіб згідно з п. 22 або 23, який **відрізняється** тим, що:

X' вибрана із групи, яка складається із -H, -OH, заміщеного або незаміщеного лінійного,

розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу і аміноблокуючої групи;

Y' вибрана із групи, яка складається із -H, оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

A і A' вибрані із -O- і -S-;

W' відсутня або вибрана із -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S- або -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;

R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sup>e</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад, -NHR<sup>101</sup>) або третинну аміногрупу (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>), або 5- або 6-членний азотвмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

G вибрана із -CH- або -N-.

25. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 22-24, який **відрізняється** тим, що W' являє собою -N(Re)-.

26. Спосіб згідно з п. 25, який **відрізняється** тим, що R<sup>e</sup> являє собою -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

27. Спосіб згідно з п. 26, який **відрізняється** тим, що R<sup>k</sup> являє собою -H або -Me, n дорівнює 4, а q дорівнює 2.

28. Спосіб згідно з п. 27, який **відрізняється** тим, що R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

29. Спосіб згідно з п. 27, який **відрізняється** тим, що R<sup>x</sup> являє собою -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, де кожна із R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup>, незалежно, вибрана із -H або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а p дорівнює 0, 1, 2 або 3.

30. Спосіб згідно з п. 29, який **відрізняється** тим, що R<sup>f</sup> і R<sup>g</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H і -Me; а p дорівнює 1.

31. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 22-30, який **відрізняється** тим, що:

як X', так і Y' являють собою -H;

як A, так і A' являють собою -O-;

R<sub>6</sub> являє собою -OMe; а

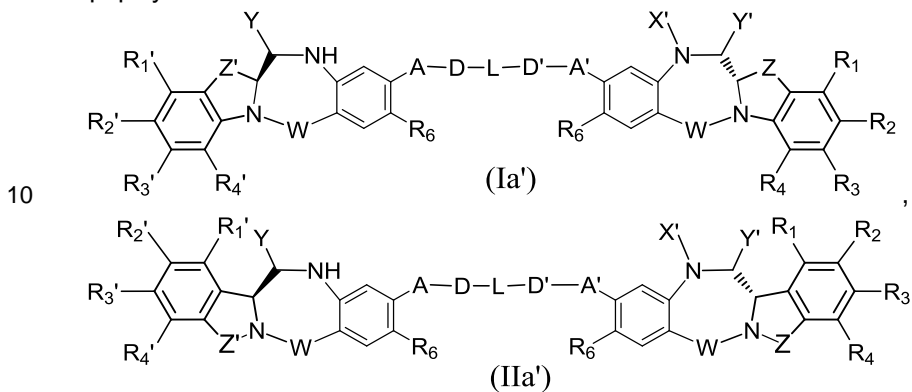
R<sup>x</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

32. Спосіб згідно з будь-яким з пп. 2-31, який **відрізняється** тим, що біфункціональний зшиваючий агент вибраний із: N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилату (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроату) (LC-SMCC), N-сукцинімідилового ефіру κ-малеїмідоундеканої кислоти (KMUA), N-сукцинімідилового ефіру γ-малеїмідомасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідного ефіру ε-малеїмідокaproнової кислоти (EMCS), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідного ефіру (MBS), N-(α-малеїмідоацетокси)-сукцинімідного ефіру (AMAS), сукцинімідил-6-(β-малеїмідопропіонамідо)гексаноату (SMPH), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутирату (SMPB), N-(п-малеїмідифеніл)ізоціанату (PMPI), N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоату (SIAB), N-сукцинімідилйодоацетату (SIA), N-сукцинімідилбромоеацетату (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромоеацетамідо)пропіонату (SBAP), біс-малеїмідополіетиленгліколю (BMPEO), BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-(β-малеїмідопропілокси)сукцинімідного ефіру (BMPS), NHS 5-малеїмідовалеріаної кислоти, HBVS, гідразиду HCl 4-(4-N-малеїмідифеніл)-масляної кислоти (MPBH), сукцинімідил-(4-вінілсульфоніл)бензоату (SVSB), дитіобіс-малеїмідоетану (DTME), 1,4-біс-малеїмідобутану (BMB), 1,4-біс-малеїмідил-2,3-дигідроксибутану (BMD), біс-малеїмідогексану (BMH), біс-малеїмідоетану (BMOE), сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC), сульфосукцинімідил(4-йодоацетил)амінобензоату (сульфо-SIAB), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру (сульфо-MBS), N-(γ-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-GMBS),

N-(ε-малеїмідокaproїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-EMCS), N-(κ-малеїмідоундеканоїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-KMUS), сульфосукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутирату (сульфо-SMPB), CX1-1, сульфо-Mal, ПЕГ<sub>n</sub>-Mal, N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонату (SPDP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноату (SPP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноату (SPDB) і N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноату (сульфо-SPDB).

33. Спосіб згідно з п. 32, який **відрізняється** тим, що біфункціональний зшиваючий агент вибраний із групи, яка складається із SMCC, сульфо-SMCC, N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноату (SPDB) і N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноату (сульфо-SPDB).

- 5 34. Спосіб одержання кон'югата, який включає агент, який зв'язується із клітинами (СВА), кон'югований із цитотоксичною сполукою за допомогою зв'язуючої групи, спосіб, який включає взаємодію другої модифікованої цитотоксичної сполуки з СВА за рН приблизно від 4 до 9, причому друга модифікована цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або її фармацевтично прийнятною сіллю,  
де:

Y являє собою  $-SO_3M$

- 15 X' вибрана із -H, амінблокуючої групи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів,
- 20 незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- Y' вибрана із -H, оксогрупи, зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу,
- 25 необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;
- R<sup>c</sup> являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;
- 30 кожна із R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' і R<sub>4</sub>', незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, сульфату -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, сульфонаміді, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -
- 35 OCONR'R'' і зв'язуючої групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою;
- R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- 40 кожна із R' і R'', незалежно, вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;
- 45 n являє собою ціле число від 1 до 24;

W вибрана із C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO і SO<sub>2</sub>;

R<sub>6</sub> являє собою -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, галоген або зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою;

Z і Z', незалежно, вибрані із -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>- і -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-;

n' і na' є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

R<sub>7</sub> і R<sub>8</sub> є однаковими або різними, і кожна із них незалежно вибрана із -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від 2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

R<sub>9</sub>, незалежно, вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

A і A' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -O-, оксо (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR<sub>5</sub> і -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

R<sub>5</sub>, в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

D і D' є однаковими або різними і, незалежно, відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

L відсутня, являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою, мономер поліетиленгліколю -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл або алкеніл, необов'язково, заміщені зв'язуючою групою з приєднаною до неї реакційноздатною групою, феніл або гетероциклічне, або гетероарильне кільце можуть бути, необов'язково, заміщені, причому замітник може являти собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою,

причому реакційноздатна група вибрана з реакційноздатного складного ефіру і групи, здатної взаємодіяти з тіолами.

35. Спосіб згідно з п. 34, який **відрізняється** тим, що другу модифіковану цитотоксичну сполуку одержують шляхом взаємодії реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, що вибраний із сульфіту, метабісульфіту та дитіоніту, з імінвмісною цитотоксичною сполукою, яка несе зв'язуючу групу і реакційноздатну групу.

36. Спосіб згідно з п. 34 або 35, який **відрізняється** тим, що додатково включає очищення другої цитотоксичної сполуки до взаємодії з СВА.

37. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 34-36, який **відрізняється** тим, що реакційноздатний складний ефір може бути вибраний із групи, яка складається із N-гідроксисукцинімідного ефіру, N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру, нітрофенілового ефіру, динітрофенілового ефіру, тетрафторофенілового ефіру, сульфотетрафторофенілового ефіру і пентафторофенілового ефіру.

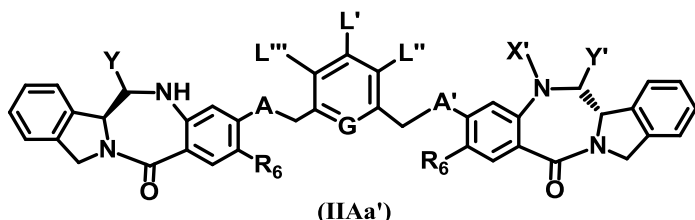
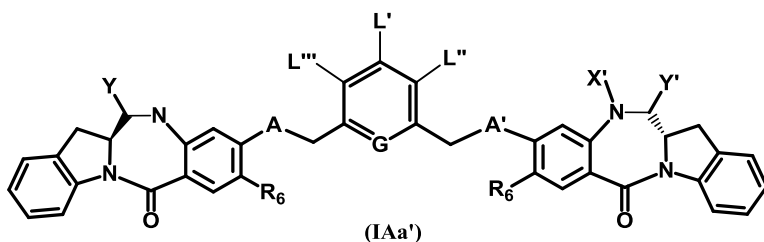
38. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 34-36, який **відрізняється** тим, що реакційноздатний складний ефір являє собою N-гідроксисукцинімідний ефір.

39. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 34-36, який **відрізняється** тим, що група, здатна взаємодіяти з тіолами, вибрана із групи, яка складається із малеїмідо, вінілпіридину, вінілсульфону, вінілсульфонаміду, групи на основі галоацетилю і дисульфідної групи.

40. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 34-36, який **відрізняється** тим, що група, здатна взаємодіяти з тіолами, являє собою малеїмідо, галоацетамідо або -SSR<sup>d</sup>, де R<sup>d</sup> являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, феніл, нітрофеніл, динітрофеніл, карбоксинітрофеніл, піридил, 2-нітропіридил, 4-нітропіридил або 3-карбокси-4-нітропіридил.

41. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 34-40, який **відрізняється** тим, що L відсутня або вибрана з необов'язково заміщеної фенільної групи і необов'язково заміщеної піридильної групи, де фенільна і піридильна група несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою, або L є аміногрупою, яка несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою (тобто -N(зв'язуюча група)-), або L являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який несе зв'язуючу групу із приєднаною до неї реакційноздатною групою.

42. Спосіб згідно з п. 41, який **відрізняється** тим, що друга модифікована цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:



або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

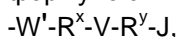
- 5 L', L'' і L''' є однаковими або різними і, незалежно, вибрані із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , галогену, гуанідинію  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, сульфоксиду, представленого -SOR', сульфону, представленого -SO<sub>2</sub>R', сульфонату -SO<sub>3</sub>M, сульфату -OSO<sub>3</sub>M, сульфонаміду, представленого -SO<sub>2</sub>NR'R'', ціаногрупи, азидної групи, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' і зв'язуючої
- 10 групи з приєднаною до неї реакційноздатною групою, за умови, що тільки одна із L', L'' і L''' являє собою зв'язуючу групу з приєднаною до неї реакційноздатною групою; M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон; а
- G вибрана із -CH- або -N-.

43. Спосіб згідно з п. 42, який **відрізняється** тим, що одна з L', L'' або L''' є зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою, у той час як інші являють собою -H.

44. Спосіб згідно з п. 43, який **відрізняється** тим, що L' є зв'язуючою групою із приєднаною до неї реакційноздатною групою, а L'' і L''' являють собою -H.

45. Спосіб згідно з п. 43 або 44, який **відрізняється** тим, що як A, так і A' являють собою -O-, R<sub>6</sub> являє собою -OMe, а G являє собою -CH-.

46. Спосіб згідно з пп. 43, 44 або 45, який **відрізняється** тим, що L' представлена наступною формулою:



де:

- 25 W<sup>i</sup> і V є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, відсутня або вибрана із -CR<sup>e</sup>R<sup>e'</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-, -O-C(=O)O-, -O-C(=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -SS- або -C(=O)-, або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

- 30 R<sup>x</sup> і R<sup>y</sup> є однаковими або різними, і кожна із них, незалежно, відсутня або являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

- R<sup>e</sup> і R<sup>e'</sup> є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, де R<sup>k</sup> являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад, -NHR<sup>101</sup>) або третинну аміногрупу (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>), або 5- або 6-членний азотвмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

- 40 n являє собою ціле число від 1 до 24;

- J включає реакційноздатну групу, зв'язану з нею, і вибрана із maleimide, haloacetamide, -SH, -SSR<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>SH, -CH(Me)SH, -C(Me)<sub>2</sub>SH і -COE, де -COE являє собою реакційноздатний складний ефір, вибраний із N-гідроксисукцинімідного ефіру, N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру, нітрофенілового (наприклад, 2- або 4-нітрофенілового) ефіру, динітрофенілового (наприклад, 2,4-динітрофенілового) ефіру, сульфотетрафторфенілового (наприклад, 4-сульфо-2,3,5,6-

тетрафторофенілового) ефіру і пентафторофенілового ефіру, але не обмежуючись ними, а  $R^{c1}$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, а

5  $R^d$  вибрана із фенілу, нітрофенілу (наприклад, 2- або 4-нітрофенілу), динітрофенілу (наприклад, 2- або 4-нітрофенілу), карбоксинітрофенілу (наприклад, 3-карбокси-4-нітрофенілу), піридилу або нітропіридилу (наприклад, 4-нітропіридилу).

47. Спосіб згідно з п. 46, який **відрізняється** тим, що J являє собою -SH, -SSR<sup>d</sup>, малеїмід або N-гідроксисукцинімідний ефір.

48. Спосіб згідно з п. 46 або 47, який **відрізняється** тим, що:

10  $R^e$  являє собою -H або -Me;

$R^e$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

n являє собою ціле число від 2 до 8; а

$R^k$  являє собою -H, -Me або  $-CH_2CH_2-NMe_2$ .

15 49. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 46-48, який **відрізняється** тим, що V являє собою амінокислоту або пептид, який має від 2 до 8 амінокислот.

50. Спосіб згідно з п. 49, який **відрізняється** тим, що V є валін-цитруліном, gly-gly-gly або ala-leu-ala-leu.

51. Спосіб згідно з п. 46, який **відрізняється** тим, що:

20  $W'$  являє собою -O-,  $-N(R^e)$ - або  $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

$R^e$  являє собою -H, лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю, або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

$R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

V відсутня або являє собою  $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ ,  $-C(=O)-NH-$ , -S-,  $-NH-C(=O)-$ ;

25  $R^y$  відсутня або являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а

J являє собою -SH, -SSR<sup>d</sup> або -COE.

52. Спосіб згідно з п. 46, який **відрізняється** тим, що:

$W'$  являє собою -O-,  $-N(R^e)$ - або  $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

30  $R^e$  являє собою -H, -Me або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ;

n являє собою ціле число від 2 до 6;

$R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, яке несе від 1 до 6 атомів вуглецю;

V і  $R^y$  відсутні; а

J являє собою -COE.

35 53. Спосіб згідно з п. 51 або 52, який **відрізняється** тим, що -COE являє собою N-гідроксисукцинімідний ефір.

54. Спосіб згідно з п. 46, який **відрізняється** тим, що L' представлена наступною формулою:

$-W'-[CR_1''R_2'']_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3''R_4'']_b-COE$ ,

де:

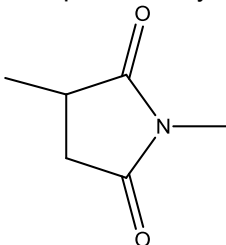
40 кожна із  $R_1''$ ,  $R_2''$  і  $R_3''$ , незалежно, являє собою -H або -Me;

$R_4''$  являє собою -H, -Me,  $-SO_3H$  або  $-SO_3^-M^+$ , де  $M^+$  являє собою фармацевтично прийнятний катіон;

a являє собою ціле число від 0 до 2, b являє собою ціле число від 0 до 3; а

Sy являє собою, необов'язково, заміщене 5-членне гетероциклічне кільце, яке несе гетероатом

45 N, переважно Sy являє собою



55. Спосіб згідно з п. 46 або 54, який **відрізняється** тим, що  $W'$  являє собою  $-N(Re)-$ .

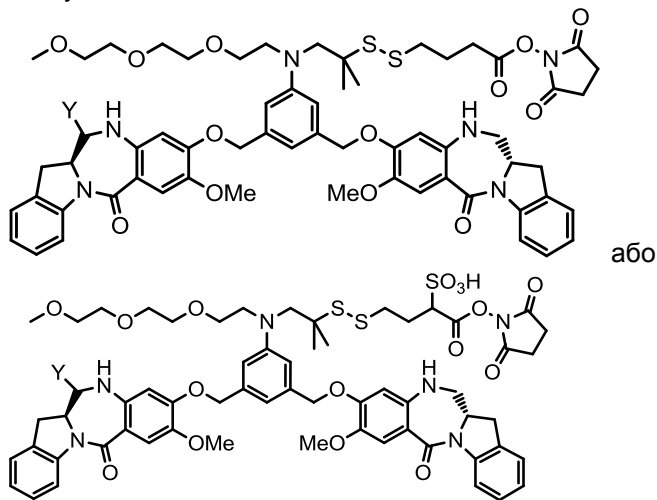
56. Спосіб згідно з пп. 46, 54 або 55, який **відрізняється** тим, що  $R^e$  являє собою  $-(CH_2-CH_2-O)_2-6-R^k$ , де  $R^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

57. Спосіб згідно з пп. 46, 54, 55 або 56, який **відрізняється** тим, що V являє собою -S- або -SS-.

58. Спосіб згідно з пп. 46, 54, 55, 56 або 57, який **відрізняється** тим, що L' представлена наступною формулою:

- NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>"R<sub>2</sub>"]<sub>a</sub>-S-[CR<sub>3</sub>"R<sub>4</sub>"]<sub>b</sub>-COE .

59. Спосіб згідно з п. 11 або 34, який **відрізняється** тим, що друга модифікована цитотоксична сполука являє собою:

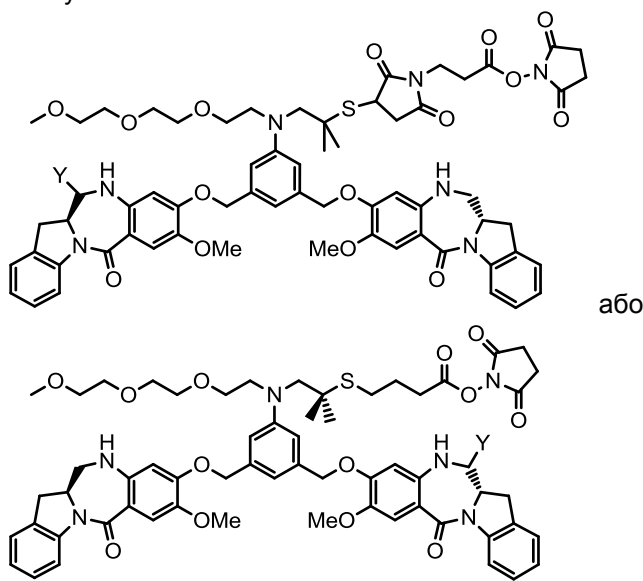


або її фармацевтично прийнятну сіль, де Y являє собою -SO<sub>3</sub>M, а M являє собою H або фармацевтично прийнятний катіон.

60. Спосіб згідно з пп. 46, 54, 55, 56 або 57, який **відрізняється** тим, що L' представлена наступною формулою:

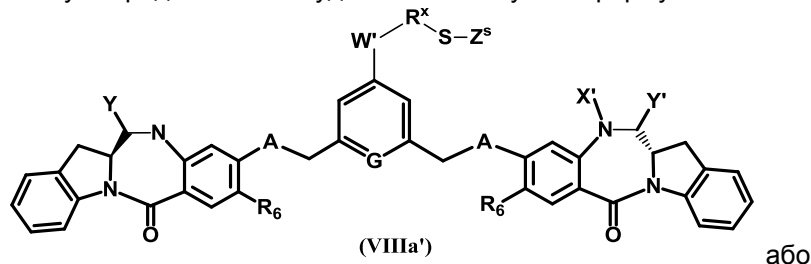
- NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>"R<sub>2</sub>"]<sub>a</sub>-S-Cy-[CR<sub>3</sub>"R<sub>4</sub>"]<sub>b</sub>-COE.

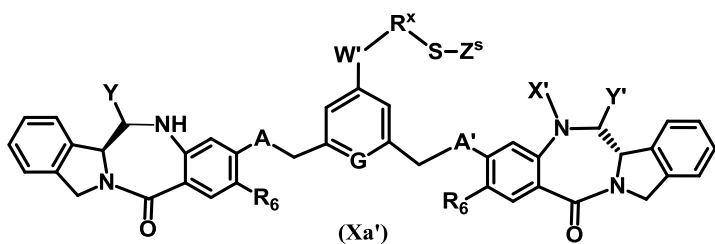
61. Спосіб згідно з п. 11 або 34, який **відрізняється** тим, що друга модифікована цитотоксична сполука являє собою:



або її фармацевтично прийнятну сіль, де Y являє собою -SO<sub>3</sub>M, а M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон.

62. Спосіб згідно з п. 11 або 34, який **відрізняється** тим, що друга модифікована цитотоксична сполука представлена будь-якою з наступних формул:





або її фармацевтично прийнятною сіллю, де:

Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ;

5 X' вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ , заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенілу та аміноблокуючої групи;

Y' вибрана із групи, яка складається із  $-\text{H}$ , оксогрупи, заміщеного або незаміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

10 A і A' вибрані із  $-\text{O}-$  і  $-\text{S}-$ ;

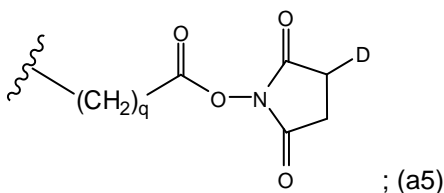
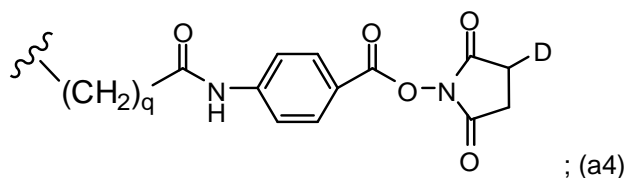
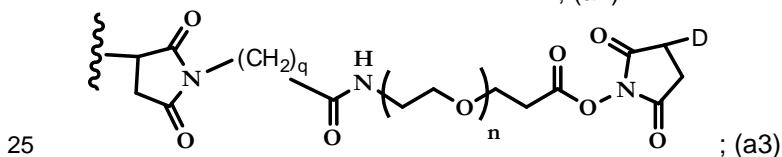
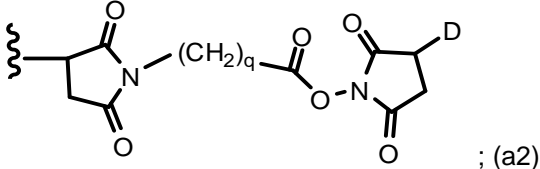
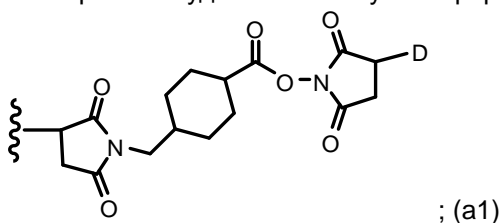
W' відсутня або вибрана із  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ ,  $-\text{S}-$  або  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ;

R<sup>x</sup> відсутня або вибрана із лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

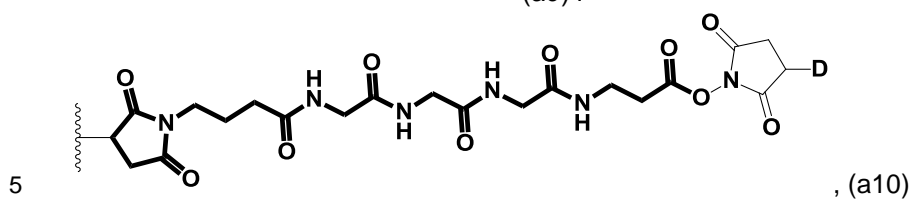
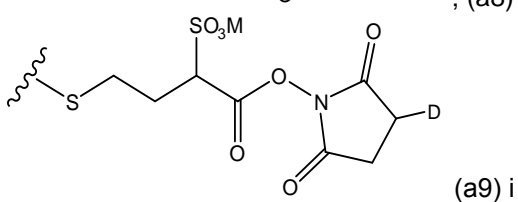
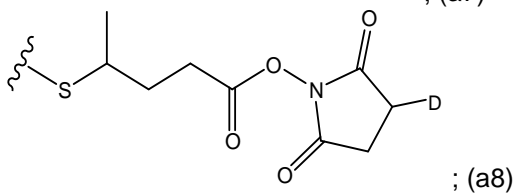
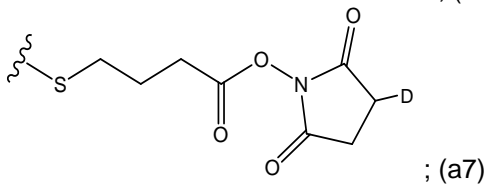
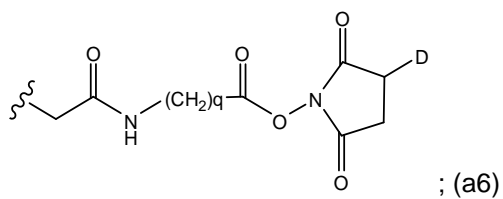
15 R<sup>e</sup> являє собою  $-\text{H}$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , де R<sup>k</sup> являє собою  $-\text{H}$ , лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-\text{NHR}^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ), або 5- або 6-членний азотвмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із R<sup>101</sup> і R<sup>102</sup>, незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

20 G вибрана із  $-\text{CH}-$  або  $-\text{N}-$ ;

Z<sup>s</sup> вибрана із будь-якої з наступних формул:







де:

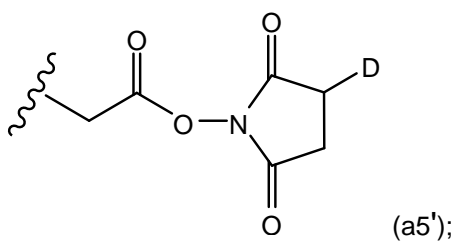
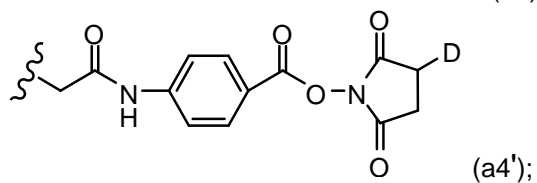
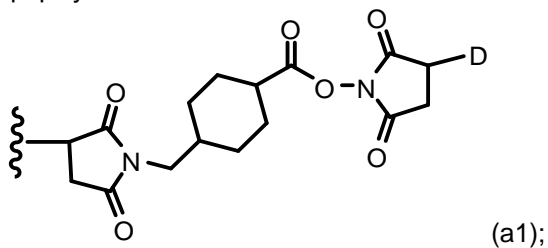
q являє собою ціле число від 1 до 5; переважно q дорівнює 2;

p являє собою ціле число від 2 до 6; переважно p дорівнює 4;

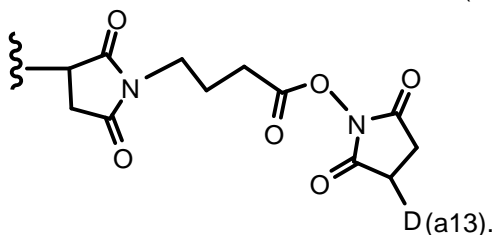
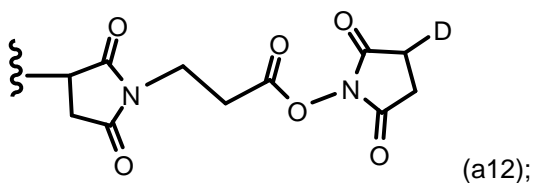
D являє собою -H або -SO<sub>3</sub>M;

10 M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, наприклад, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

63. Спосіб згідно з п. 62, який **відрізняється** тим, що Z<sup>s</sup> представлена будь-якою з наступних формул:



15



64. Спосіб згідно з п. 62 або 63, який **відрізняється** тим, що  $W'$  являє собою  $-N(Re)-$ .

65. Спосіб згідно з п. 64, який **відрізняється** тим, що  $R^e$  являє собою  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою  $-H$ , лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

66. Спосіб згідно з п. 65, який **відрізняється** тим, що  $R^k$  являє собою  $-H$  або  $-Me$ ,  $n$  дорівнює 4, а  $q$  дорівнює 2.

67. Спосіб згідно з п. 66, який **відрізняється** тим, що  $R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

68. Спосіб згідно з п. 66, який **відрізняється** тим, що  $R^x$  являє собою  $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ , де кожна із  $R^f$  і  $R^g$ , незалежно, вибрана із  $-H$  або лінійного або розгалуженого алкілу, який має від 1 до 4 атомів вуглецю; а  $p$  дорівнює 0, 1, 2 або 3.

69. Спосіб згідно з п. 68, який **відрізняється** тим, що  $R^f$  і  $R^g$  є однаковими або різними і вибрані із  $-H$  і  $-Me$ ; а  $p$  дорівнює 1.

70. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 62-69, який **відрізняється** тим, що:

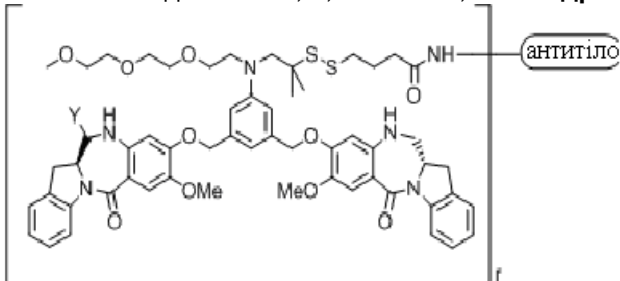
як  $X'$ , так і  $Y'$  являють собою  $-H$ ;

як  $A$ , так і  $A'$  являють собою  $-O-$ ;

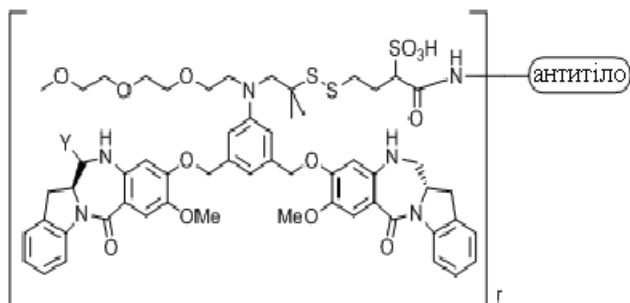
$R_6$  являє собою  $-OMe$ ; а

$R^x$  являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю.

71. Спосіб згідно з пп. 1, 7, 11 або 43, який **відрізняється** тим, що кон'югат являє собою:



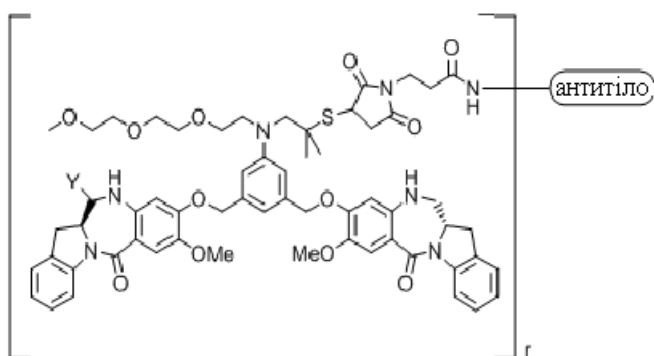
або



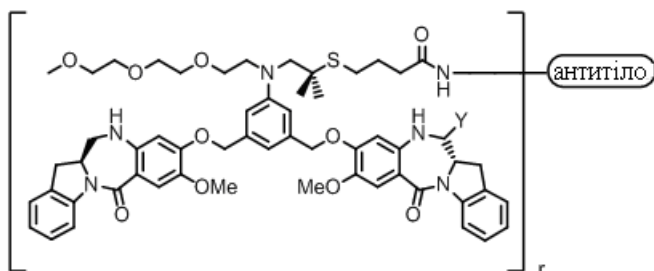
або її фармацевтично прийнятну сіль, де  $g$  є цілим числом від 1 до 10,  $Y$  являє собою  $-SO_3M$ , а  $M$  являє собою  $-H$  або фармацевтично прийнятний катіон.

72. Спосіб згідно з п. 71, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою huMy9-6.

73. Спосіб згідно з п. 1, 7, 11 або 43, який **відрізняється** тим, що кон'югат являє собою:



або



або її фармацевтично прийнятну сіль, де  $r$  є цілим числом від 1 до 10,  $Y$  являє собою  $-SO_3M$ , а  $M$  являє собою  $-H$  або фармацевтично прийнятний катіон.

74. Спосіб згідно з п. 73, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою huMy9-6.

75. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-74, який **відрізняється** тим, що кон'югат включає 1-10 цитотоксичних сполук.

76. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-75, який **відрізняється** тим, що агент, який зв'язується із клітинами, зв'язується із клітинами-мішенями, вибраними з пухлинних клітин, клітин, інфікованих вірусом, клітин, інфікованих мікроорганізмами, клітин, інфікованих паразитами, аутоімунних клітин, активованих клітин, мієлоїдних клітин, активованих Т-клітин, В-клітин або меланоцитів; клітин, які експресують CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA або антигени HER-2, антигени Her-3; або клітин, які експресують рецептор інсуліноподібного фактора росту, рецептор епідермального фактора росту і рецептор фолату.

77. Спосіб згідно з п. 76, який **відрізняється** тим, що агент, який зв'язується із клітинами, є антитілом, одноланцюговим антитілом, фрагментом антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, моноклональним антитілом, одноланцюговим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, химерним антитілом, фрагментом химерного антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, доменним антитілом, фрагментом доменного антитіла, який специфічно зв'язується із клітиною-мішенню, лімфокіном, гормоном, вітаміном, фактором росту, колонієстимулюючим фактором або молекулою транспорту поживних речовин.

78. Спосіб згідно з п. 77, який **відрізняється** тим, що антитіло є антитілом з модифікованою поверхнею, одноланцюговим антитілом з модифікованою поверхнею або фрагментом антитіла з модифікованою поверхнею.

79. Спосіб згідно з п. 77, який **відрізняється** тим, що антитіло є моноклональним антитілом, одноланцюговим моноклональним антитілом або фрагментом моноклонального антитіла.

80. Спосіб згідно з п. 77, який **відрізняється** тим, що антитіло є гуманізованим антитілом, гуманізованим одноланцюговим антитілом або фрагментом гуманізованого антитіла.

81. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-80, який **відрізняється** тим, що реагент, здатний взаємодіяти з імінами, являє собою  $NaHSO_3$  або  $KHSO_3$ .

82. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-81, який **відрізняється** тим, що використовують від приблизно 0,1 до приблизно 30 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, стосовно імінвмісної цитотоксичної сполуки.

83. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-81, який **відрізняється** тим, що використовують від приблизно 1 до приблизно 10 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, стосовно імінвмісної цитотоксичної сполуки.

84. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 2-81, який **відрізняється** тим, що використовують від приблизно 3 до приблизно 5 молярних еквівалентів реагенту, здатного взаємодіяти з імінами,

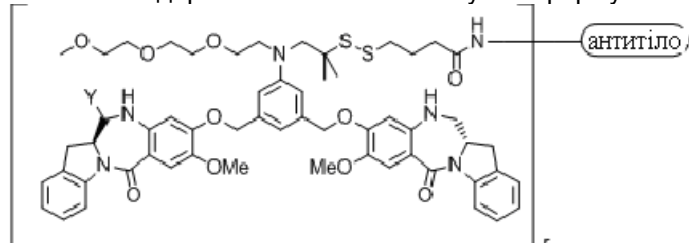
СТОСОВНО ІМІНВІСНОЇ ЦИТОТОКСИЧНОЇ СПЛУКИ.

85. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-84, який **відрізняється** тим, що кон'югат очищають за допомогою тангенціальної проточної фільтрації, адсорбційної хроматографії, адсорбційної фільтрації, вибіркового осадження, неадсорбційної фільтрації або їх комбінації.

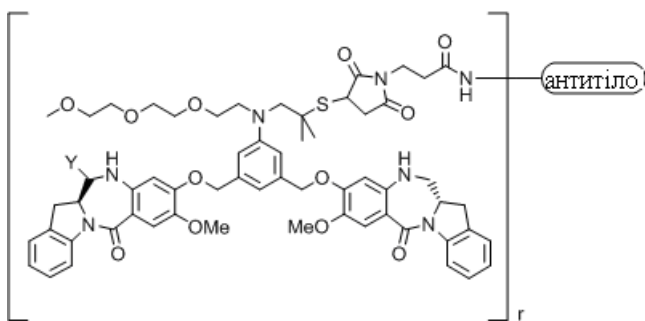
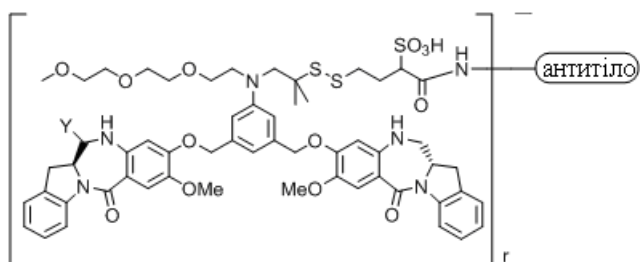
5 86. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-84, який **відрізняється** тим, що кон'югат очищають за допомогою тангенціальної проточної фільтрації і/або адсорбційної хроматографії.

87. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 1-86, який **відрізняється** тим, що М являє собою Н, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

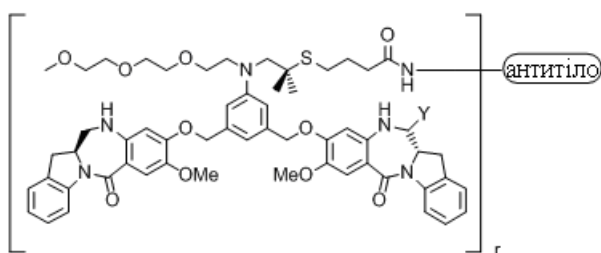
88. Спосіб одержання кон'югата наступної формули:



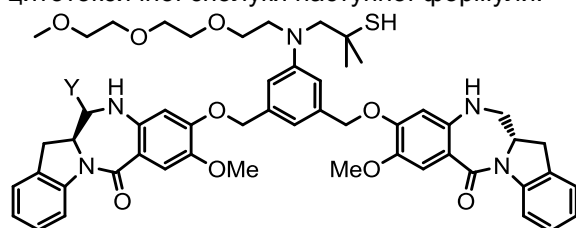
10



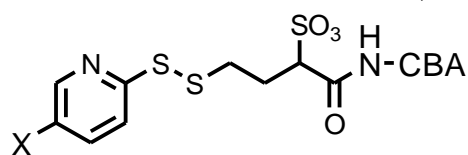
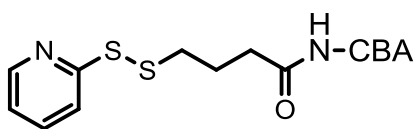
або



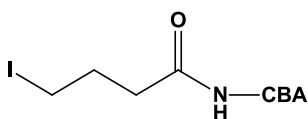
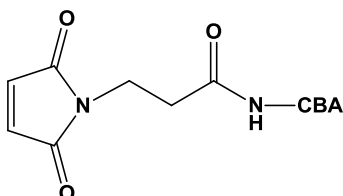
або його фармацевтично прийнятної солі, спосіб, який включає взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки наступної формули:



з модифікованим СВА наступної формули, відповідно, за рН від приблизно 4 до приблизно 9,



$X = -H$  або  $-NO_2$



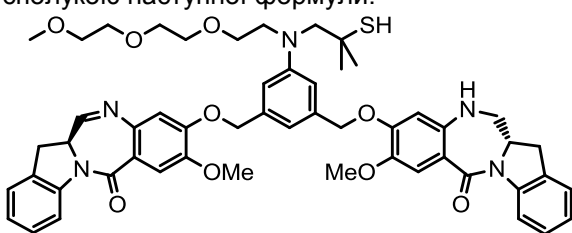
5 де:

г являє собою ціле число від 1 до 10;

У являє собою  $-SO_3M$ ; а

М являє собою  $-H$  або фармацевтично прийнятний катіон.

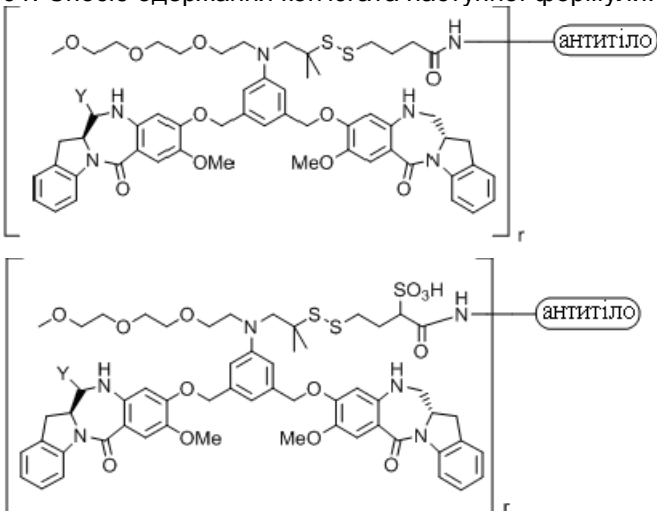
89. Спосіб згідно з п. 88, який **відрізняється** тим, що модифіковану цитотоксичну сполуку одержують взаємодією реагенту, здатного взаємодіяти з імінами, з імінвмісною цитотоксичною сполукою наступної формули:



причому реагент, здатний взаємодіяти з імінами, являє собою  $NaHSO_3$  або  $KHSO_3$ .

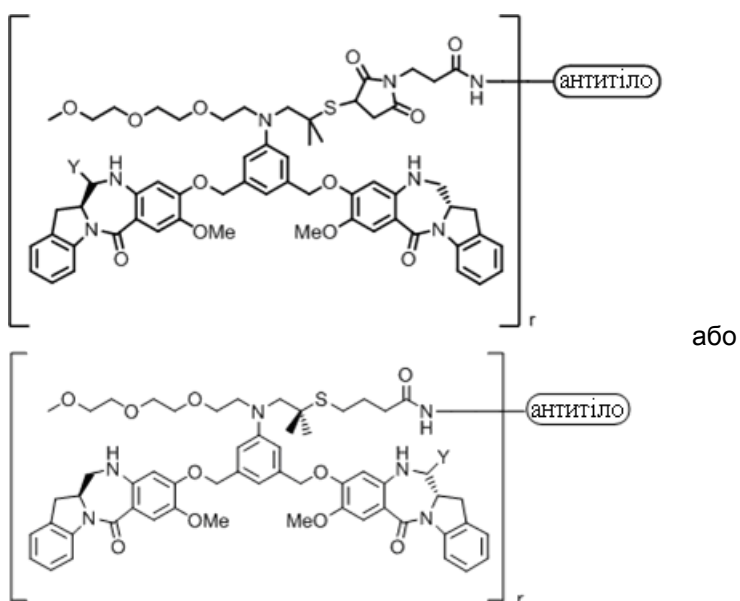
90. Спосіб згідно з п. 88 або 89, який **відрізняється** тим, що CBA являє собою  $hiMu9-6$ .

15 91. Спосіб одержання кон'югата наступної формули:



АНТИТІЛО

АНТИТІЛО

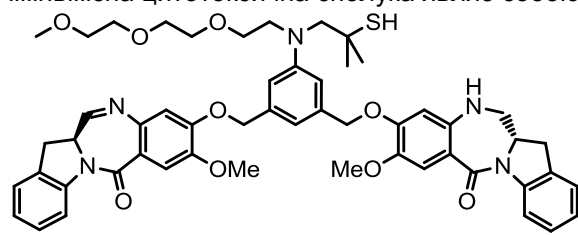


або його фармацевтично прийнятної солі, спосіб, який включає взаємодію СВА з імінвмісною цитотоксичною сполукою, реагентом, здатним взаємодіяти з імінами, і біфункціональним зшиваючим агентом, який містить зв'язуючу групу, з утворенням кон'югата, де:

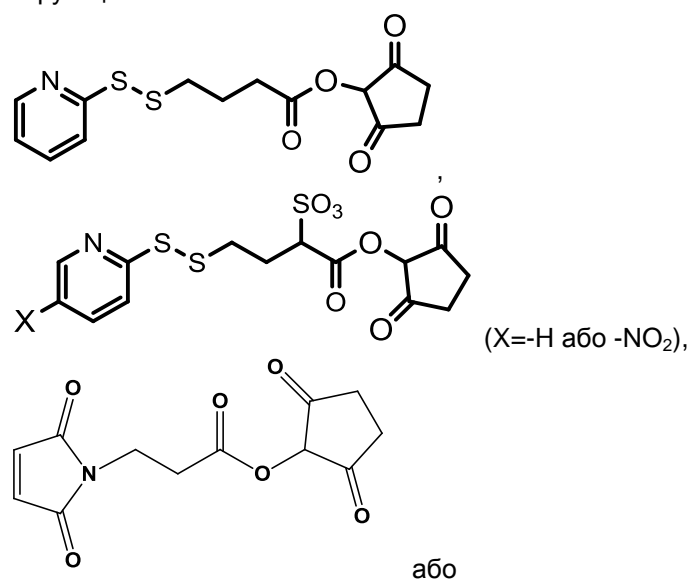
Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ;

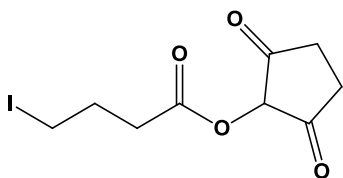
M являє собою  $-\text{H}$ ,  $\text{Na}^+$  або  $\text{K}^+$ ;

імінвмісна цитотоксична сполука являє собою:



біфункціональний зшиваючий агент являє собою:





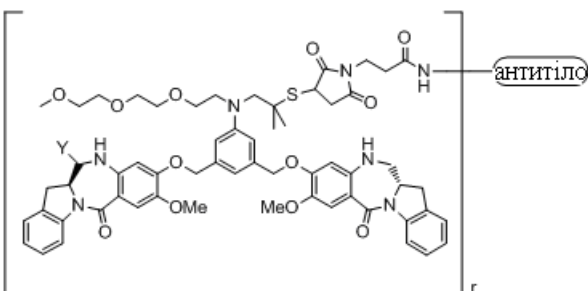
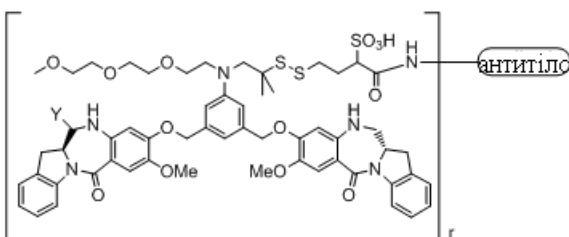
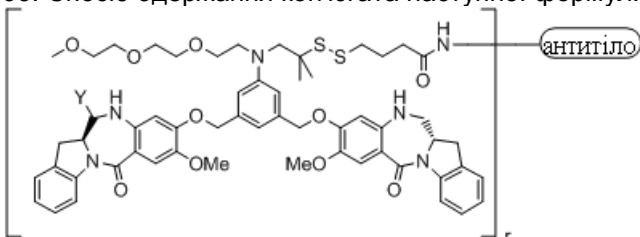
, відповідно, і

реагент, здатний взаємодіяти з імінами, являє собою  $\text{NaHSO}_3$  або  $\text{KHSO}_3$ .

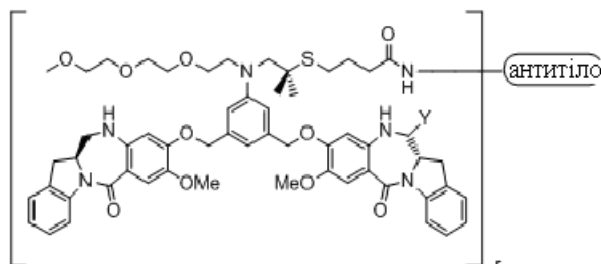
92. Спосіб згідно з п. 91, який **відрізняється** тим, що СВА являє собою huMy9-6.

93. Спосіб одержання кон'югата наступної формули:

5



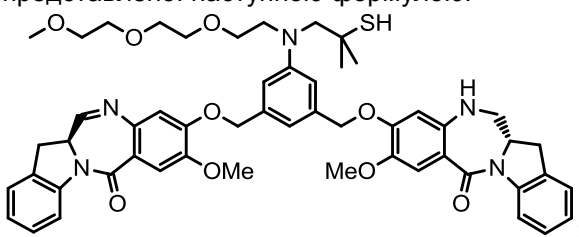
, або



10

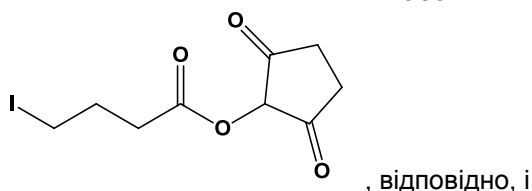
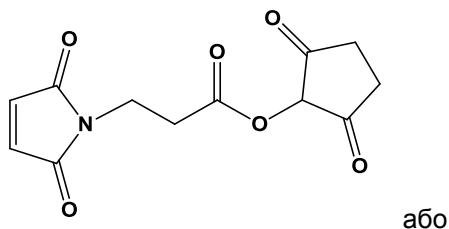
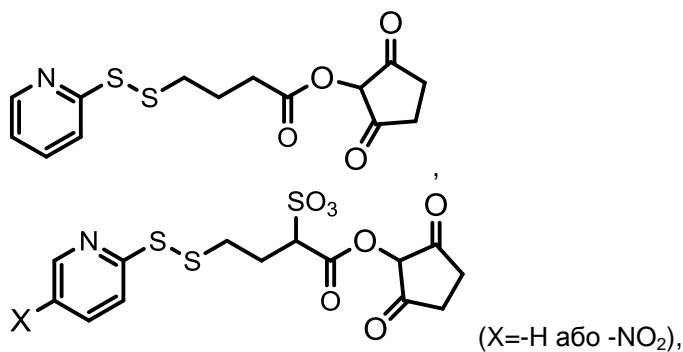
або його фармацевтично прийнятної солі, де Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ; а M являє собою -H або фармацевтично прийнятний катіон, причому спосіб включає:

а) взаємодію модифікованого цитотоксичного агента з біфункціональним зшиваючим агентом з утворенням другого модифікованого цитотоксичного агента, причому модифікований цитотоксичний агент одержаний шляхом взаємодії імінвмісної цитотоксичної сполуки, представлені наступною формулою:



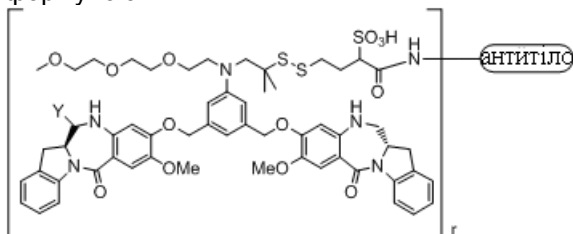
15

або її фармацевтично прийнятної солі, з  $\text{NaHSO}_3$  або  $\text{KHSO}_3$ , і причому біфункціональний зшиваючий агент являє собою:

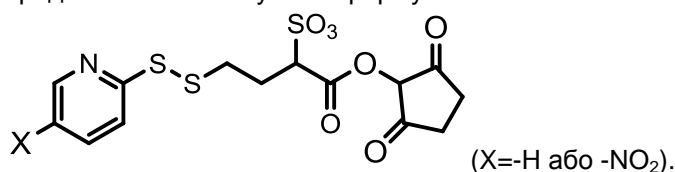


б) взаємодію другої модифікованої цитотоксичної сполуки з антитілом при рН від приблизно 4 до приблизно 9 з утворенням кон'югата.

94. Спосіб згідно з п. 93, який **відрізняється** тим, що кон'югат представлений наступною формулою:



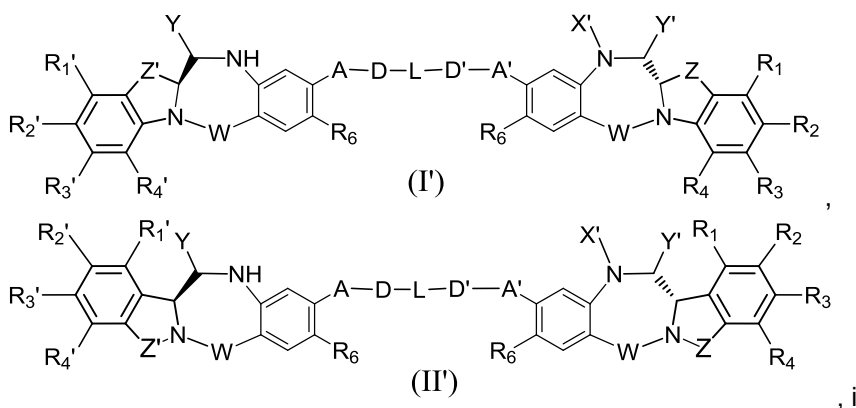
або його фармацевтично прийнятною сіллю, а біфункціональний зшиваючий агент представлений наступною формулою:



95. Спосіб згідно з п. 93 або 94, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою huMy9-6.

96. Спосіб одержання другої модифікованої цитотоксичної сполуки, що включає взаємодію модифікованої цитотоксичної сполуки з біфункціональним зшиваючим агентом, який включає зв'язуючу групу, групу, яка реагує з СВА, і групу, здатну взаємодіяти з модифікованою цитотоксичною сполукою з утворенням другої модифікованої цитотоксичної сполуки, ковалентно зв'язаної із залишком біфункціонального зшиваючого агента, причому зазначений залишок включає зв'язуючу групу і групу, здатну реагувати з СВА; причому модифікована цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:





де:

Y являє собою  $-\text{SO}_3\text{M}$ ;

- 5 X' вибрана із -H, амінблокуючої групи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

- 10 Y' вибрана із -H, оксогрупи, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 6-18-членного арилу, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів;

$\text{R}^c$  являє собою -H або заміщений, або незаміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю;

- 20 кожна із  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_1'$ ,  $\text{R}_2'$ ,  $\text{R}_3'$  і  $\text{R}_4'$ , незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ , галогену, гуанідинію  $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NCO}$ ,  $-\text{NR}'\text{COR}''$ ,  $-\text{SR}$ , сульфоксиду, представленого  $-\text{SOR}'$ , сульфону, представленого  $-\text{SO}_2\text{R}'$ , сульфонату  $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ , сульфату  $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ , сульфонаміду, представленого  $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ціаногрупи, азидної групи,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$ ;

- 25 R, в кожному випадку незалежно, вибрана із групи, яка складається із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , необов'язково заміщеного арилу, який має від 6 до 18 атомів вуглецю, необов'язково заміщеного 5-18-членного гетероарильного кільця, яке містить один або більше гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню і сірки, або необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке містить від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

- 30 кожна із  $\text{R}'$  і  $\text{R}''$  незалежно вибрана із -H, -OH, -OR, -NHR,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{COR}$ , необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$  і необов'язково заміщеного 3-18-членного гетероциклічного кільця, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P;

n являє собою ціле число від 1 до 24;

- 40 W вибрана із C=O, C=S,  $\text{CH}_2$ , BH, SO і  $\text{SO}_2$ ;

$\text{R}_6$  являє собою -H, -R, -OR, -SR,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$  або галоген;

Z і Z', незалежно, вибрані із  $-(\text{CH}_2)_{n'}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{n'a}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{n'a}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{n'a}$  і  $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n'a}$ ;

$n'$  і  $n'a$  є однаковими або різними і вибрані із 0, 1, 2 і 3;

- 45  $\text{R}_7$  і  $\text{R}_8$  є однаковими або різними, і кожна із них незалежно вибрана із -H, -OH, -SH,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NHR}'$ , мономера поліетиленгліколю  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , амінокислоти, пептидної одиниці, яка несе від

2 до 6 амінокислот, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

$R_9$ , незалежно вибрана із -H, необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

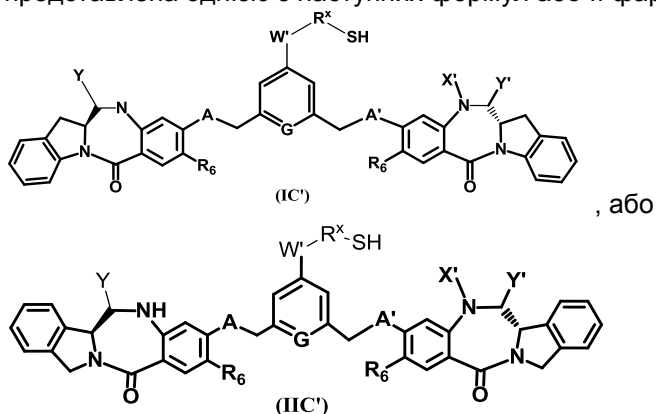
5 A і A' є однаковими або різними і незалежно вибрані із -O-, оксо  $-(C(=O)-)$ , -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N( $R_5$ )- і -CRR'N( $R_5$ )-,

$R_5$ , в кожному випадку незалежно, являє собою -H або необов'язково заміщений лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю;

10 D і D' є однаковими або різними і незалежно відсутні або вибрані із групи, яка складається із необов'язково заміщеного лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, амінокислоти, пептиду, який несе від 2 до 6 амінокислот, і мономера поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

15 L відсутня або, якщо присутня, включає тіолову групу або являє собою мономер поліетиленгліколю  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , лінійний, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, фенільну групу, 3-18-членне гетероциклічне кільце або 5-18-членне гетероарильне кільце, яке має від 1 до 6 гетероатомів, незалежно вибраних із O, S, N і P, де алкіл, алкеніл, феніл або гетероциклічне або гетероарильне кільце є, необов'язково, заміщеним.

20 97. Спосіб згідно з п. 96, який **відрізняється** тим, що модифікована цитотоксична сполука представлена однією з наступних формул або її фармацевтично прийнятною сіллю:



або її фармацевтична прийнятною сіллю, де:

25  $W'$  відсутня або, якщо присутня, вибрана із  $-CR^eR^e-$ , -O-,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)-O-$ , -S-, -SO-,  $-SO_2-$ ,  $-CH_2-S-$ ,  $-CH_2O-$ ,  $-CH_2NR^e-$ ,  $-O-(C(=O)O)-$ ,  $-O-(C(=O)N(R^e)-)$ ,  $-N(R^e)-$ ,  $-N(R^e)-C(=O)-$ ,  $-C(=O)-N(R^e)-$ ,  $-N(R^e)-C(=O)O-$ ,  $-N(C(=O)R^e)C(=O)-$ ,  $-N(C(=O)R^e)-$ ,  $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ , -SS- або  $-C(=O)-$ , або амінокислоти, або пептиду, який має від 2 до 8 амінокислот;

30  $R^x$  відсутня або, якщо присутня, являє собою необов'язково заміщений лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, арил, який має від 6 до 10 атомів вуглецю, або 3-8-членне гетероциклічне кільце, яке несе від 1 до 3 гетероатомів, вибраних із O, N або S;

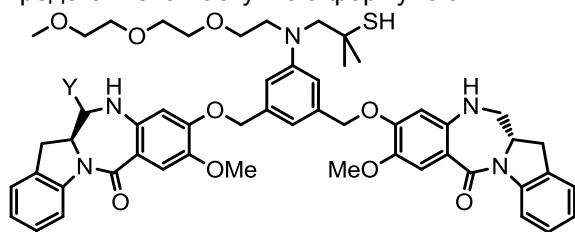
35  $R^e$  і  $R^e$  є однаковими або різними і вибрані із -H, лінійного, розгалуженого або циклічного алкілу, алкенілу або алкінілу, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ , де  $R^k$  являє собою -H, лінійний, розгалужений, циклічний алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю і який, необов'язково, несе вторинну аміногрупу (наприклад,  $-NHR^{101}$ ) або третинну аміногрупу ( $-NR^{101}R^{102}$ ), або 5- або 6-членний азотвмісний гетероцикл, наприклад, піперидин або морфолін, де кожна із  $R^{101}$  і  $R^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний, розгалужений або циклічний алкіл, алкеніл або алкініл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю; переважно кожна  $R^{101}$  і  $R^{102}$ , незалежно, являє собою лінійний або розгалужений алкіл, який має від 1 до 6 атомів вуглецю;

40 n являє собою ціле число від 1 до 24.

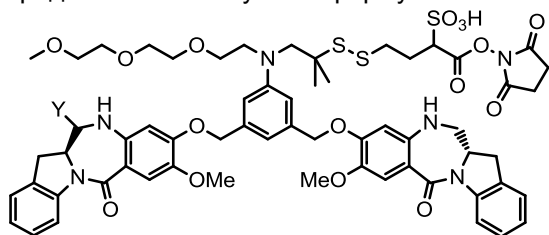
45 98. Спосіб згідно з п. 96 або 97, який **відрізняється** тим, що біфункціональний зшиваючий агент вибраний із: N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилату (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроату) (LC-SMCC), N-сукцинімідилового ефіру  $\kappa$ -малеїмідодундеканової кислоти (KMUA), N-сукцинімідилового ефіру  $\gamma$ -малеїмідомасляної кислоти (GMBS), N-гідроксисукцинімідного ефіру  $\epsilon$ -малеїмідокaproнової кислоти (EMCS), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідного ефіру (MBS), N-( $\alpha$ -малеїмідоацетокси)-сукцинімідного ефіру (AMAS), сукцинімідил-6-( $\beta$ -малеїмідопропіонамідо)гексаноату (SMPH), N-сукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутирату

(SMPB), N-(п-малеїмідифеніл)ізоціанату (PMPI), N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоату (SIAB), N-сукцинімідилйодоацетату (SIA), N-сукцинімідилбромоеацетату (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромоеацетамідо)пропіонату (SBAP), біс-малеїмідополіетиленгліколю (BMPEO), BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-(β-малеїмідопропілокси)сукцинімідного ефіру (BMPS), NHS 5-малеїмідовалеріанової кислоти, HBVS, гідразиду HCl 4-(4-N-малеїмідифеніл)-масляної кислоти (MPBH), сукцинімідил-(4-вінілсульфоніл)бензоату (SVSB), дитіобіс-малеїмідоетану (DTME), 1,4-біс-малеїмідобутану (BMB), 1,4-біс-малеїмідил-2,3-дигідроксибутану (BMDБ), біс-малеїмідогексану (BMH), біс-малеїмідоетану (BMOE), сульфосукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC), сульфосукцинімідил(4-йодоацетил)амінобензоату (сульфо-SIAB), м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисульфосукцинімідного ефіру (сульфо-MBS), N-(γ-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-GMBS), N-(ε-малеїмідокапроїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-EMCS), N-(κ-малеїмідоундеканоїлокси)сульфосукцинімідного ефіру (сульфо-KMUS), сульфосукцинімідил-4-(п-малеїмідифеніл)бутирату (сульфо-SMPB), CX1-1, сульфо-Mal, ПЕГ<sub>n</sub>-Mal, N-сукцинімідил-4-(4-нітропіридил-2-дитіо)бутаноату, N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонату (SPDP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноату (SPP), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутаноату (SPDB) і N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноату (сульфо-SPDB).

99. Спосіб згідно з п. 96, який **відрізняється** тим, що модифікована цитотоксична сполука представлена наступною формулою:



або її фармацевтично прийнятною сіллю; а друга модифікована цитотоксична сполука представлена наступною формулою:



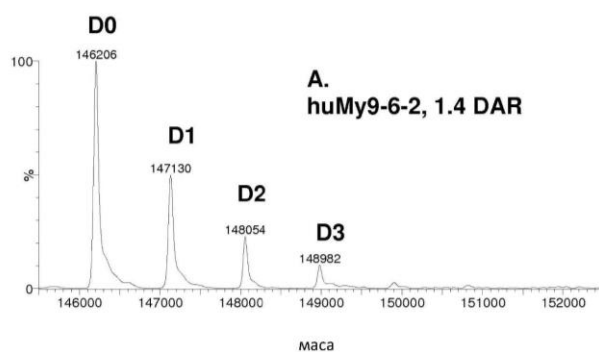
або її фармацевтично прийнятною сіллю, де Y являє собою -SO<sub>3</sub>M, а M являє собою H або фармацевтично прийнятний катіон.

100. Спосіб згідно з п. 98 або 99, який **відрізняється** тим, що біфункціональний зшиваючий агент являє собою N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB).

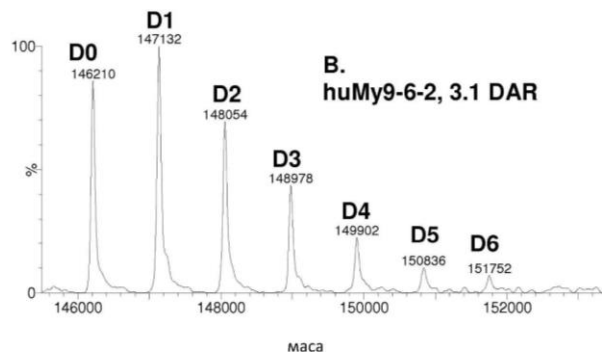
101. Спосіб згідно з будь-яким із пп. 93-100, який **відрізняється** тим, що M являє собою H, Na<sup>+</sup> або K<sup>+</sup>.

Фіг. 1А

Мас-спектрограми кон'югатів деглікозильованого huMy9-6-2, отримані без і з використанням бісульфіту, що містять 1,4 DAR (А) і 3,1 DAR (Б) відповідно.

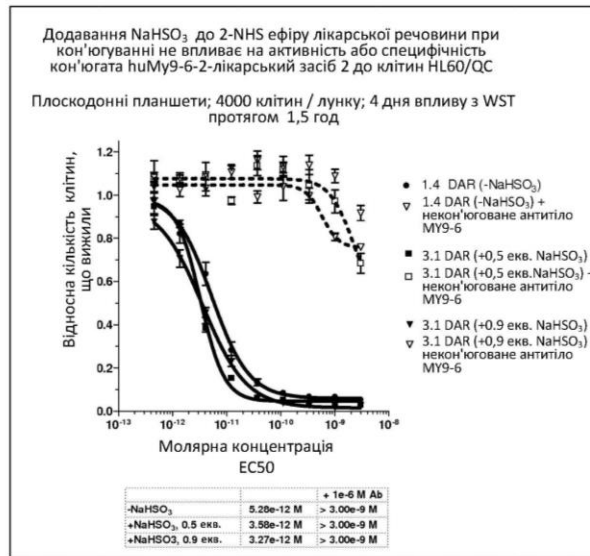


Фіг. 1В



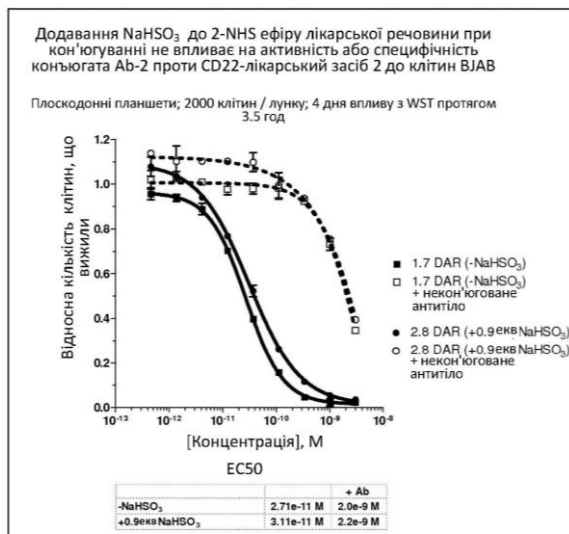
Фіг. 2

Кон'югати HmY9-6-2, отримані без і з використанням бісульфіту натрію, демонструють аналогічну цитотоксичність in vitro стосовно клітин HL60, що експресують антиген CD33



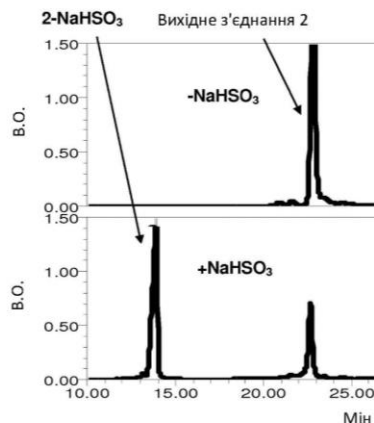
Фіг. 3

Кон'югати Ab-2 проти CD22, отримані без і з використанням бісульфіту натрію, демонструють аналогічну цитотоксичність in vitro стосовно клітин BJAB, що експресують антиген CD22



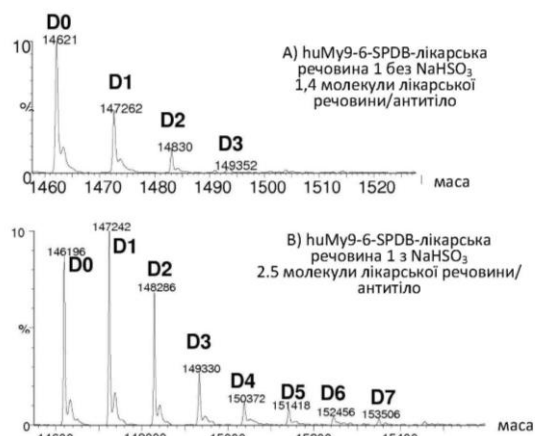
Фіг. 4

Обернено-фазовий ВЕЖХ-аналіз 2-NHS і 2-NHS, обробленого бісульфітом натрію



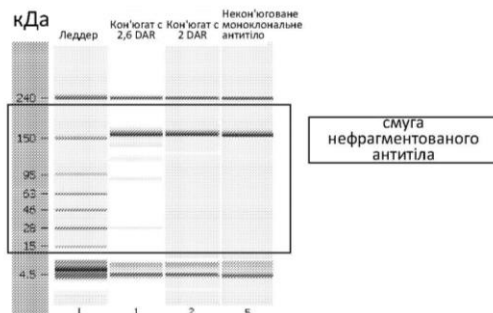
Фіг. 5

МС-Аналіз деглікозильованого huMy9-6-SPDB-1, отриманого з і без бісульфіту натрію, з використанням 7 молярних еквівалентів 1-SPDB-NHS на антитіло. А. Кон'югат одержували без використання бісульфіту натрію із середнім співвідношенням лікарська речовина 1/антитіло, рівним 1,4; кон'югат містив до трьох приєднаних молекул лікарської речовини 1 на антитіло. Б. кон'югат одержували з використанням бісульфіту натрію із середнім співвідношенням лікарська речовина 1 / антитіло, рівним 2,5; кон'югат містив до семи приєднаних молекул лікарської речовини 1 на антитіло.

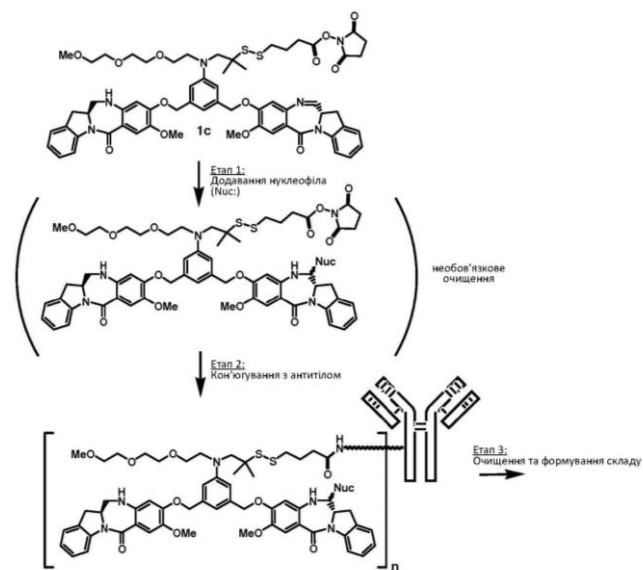


Фіг. 6

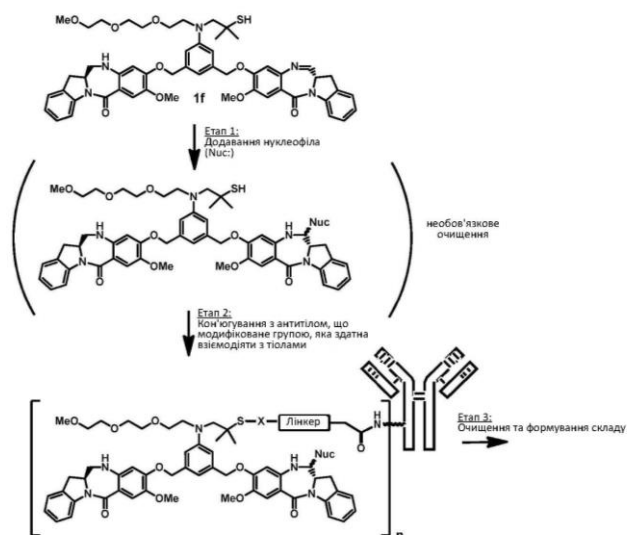
Додавання бісульфіту натрію до реакційної суміші при кон'югуванні 1-SPDB-NHS не приводить до фрагментації антитіл (електрофорез у ДСН- ПААГ, що не відновлює; аналіз геля на чипі)



Фіг. 7



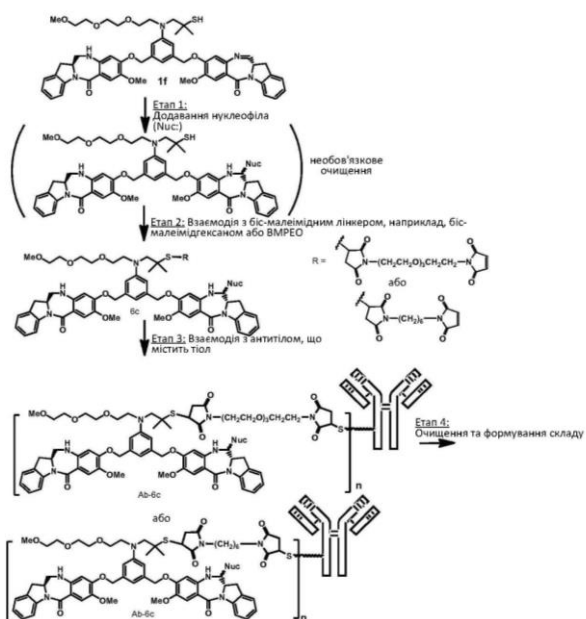
Фіг. 8



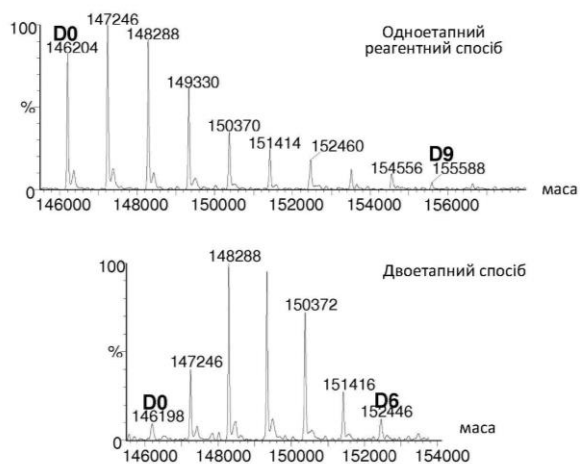




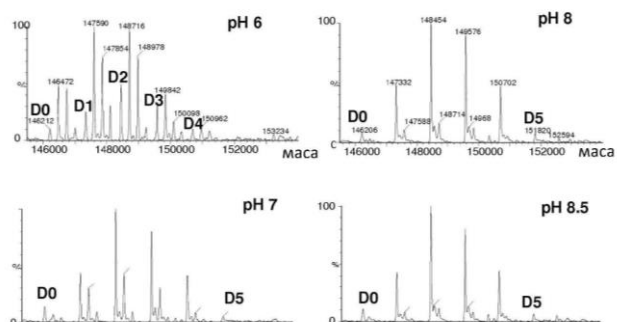
Фіг. 11



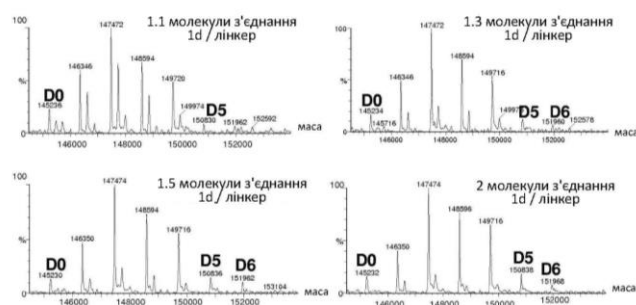
Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14

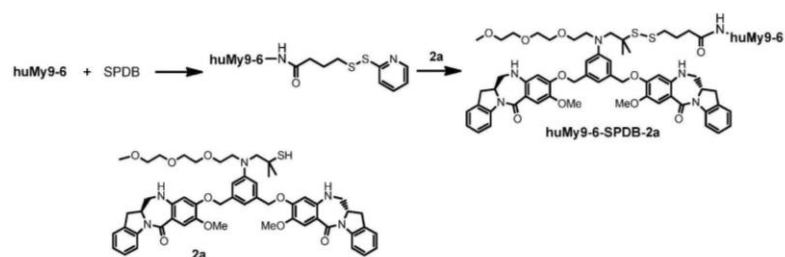


Фіг. 15

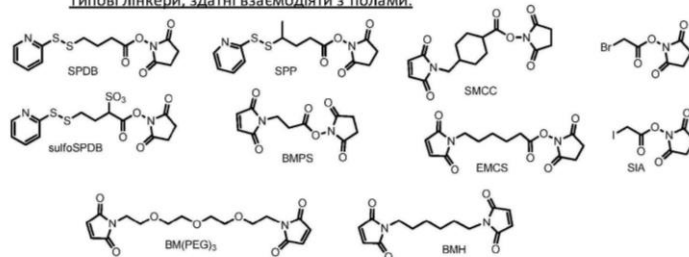
Реагент	Лікарська речовина/ антитіло (УФ- Спектроскопія)	% мономера (SEC)	% лікарської речовини в мономері
Гідросульфід натрію	2,6	88	82
Бісульфіт натрію	2,6	88	83
Метабісульфіт натрію	2,7	88	82
Без добавки	0,1	98	94

Фіг. 16

Двоетапна схема кон'югування

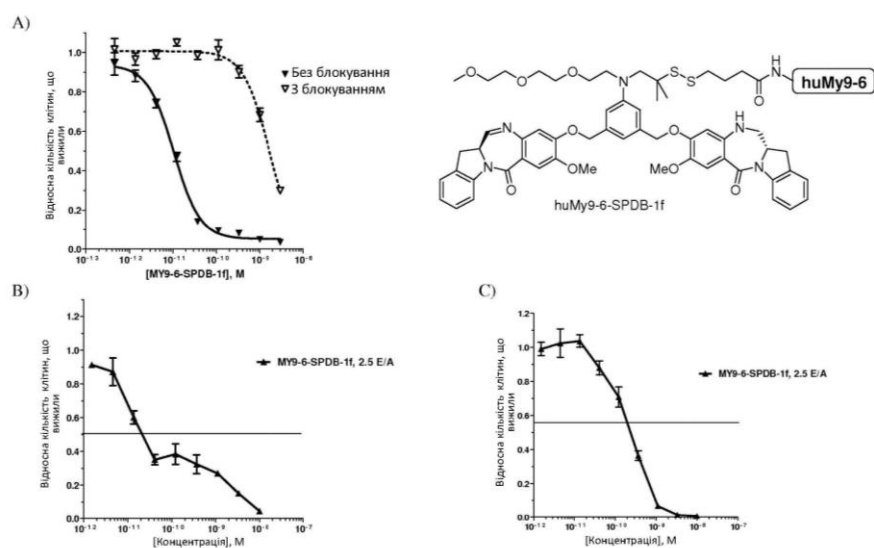


Типові лінкери, здатні взаємодіяти з тіолами:



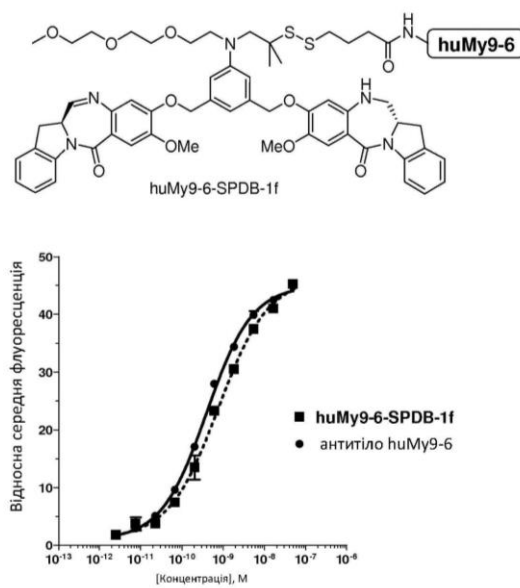
Фіг. 17

Антипроліферативна активність huMy9-6-SPDB-1f проти (А) клітин HL60/QC ( $Ag^+$ ) з та без блокування антигензв'язуючих сайтів, (Б) клітин HL60/ATCC ( $Ag^+$ ) та (В) клітин NB-4 ( $Ag^+$ )



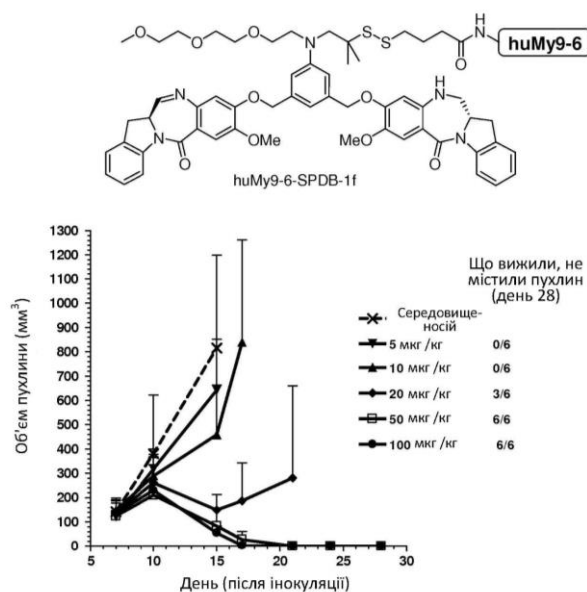
Фіг. 18

Спорідненість зв'язування huMy9-6-SPDB-1f (FACS-аналіз)



Фіг. 19

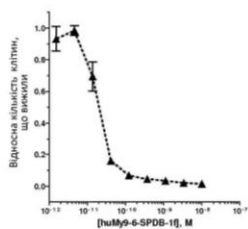
Ефективність huMy9-6-SPDB-1f *in vivo* на бестімусних мишах, що несуть пухлини HL60/QC



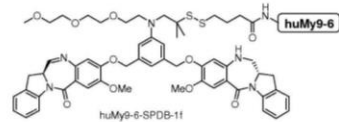
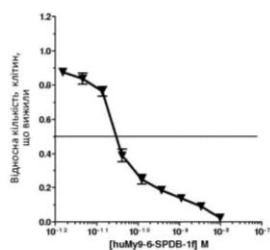
Фіг. 20

Антипроліферативна активність huMy9-6-SPDB-1f проти антиген-позитивної лінії клітин (А) клітин HL60/QC, (Б) клітин HL60/ATCC, (В) клітин NB-4 та клітин HEL 92.1.7 (Г)

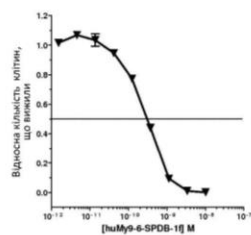
А)



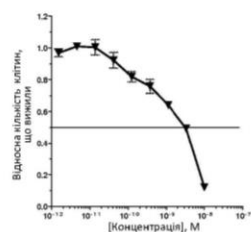
Б)



В)

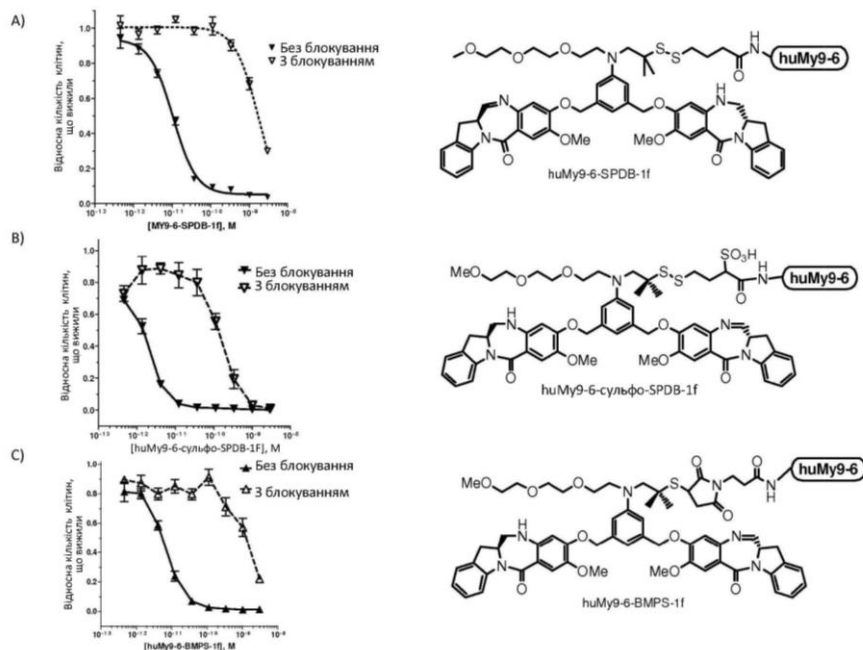


Г)



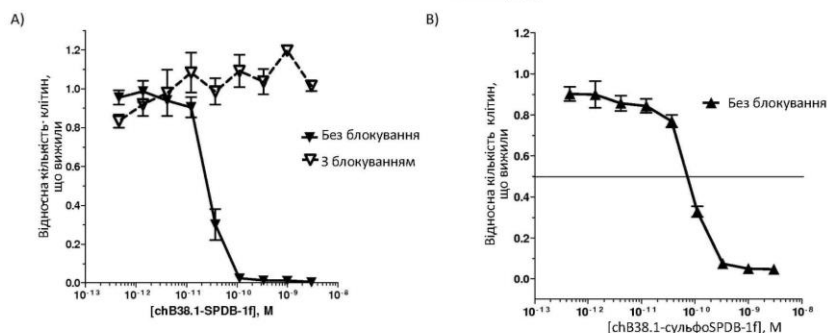
Фіг. 21

Порівняльна антипроліферативна активність (А) huMy9-6-SPDB-1f і (Б) huMy9-6-сульфо-SPDB-1f, та (В) huMy9-6-BMPS-1f проти клітин HL60/QC (Ag<sup>+</sup>) з та без блокування антигенів'язуючих сайтів



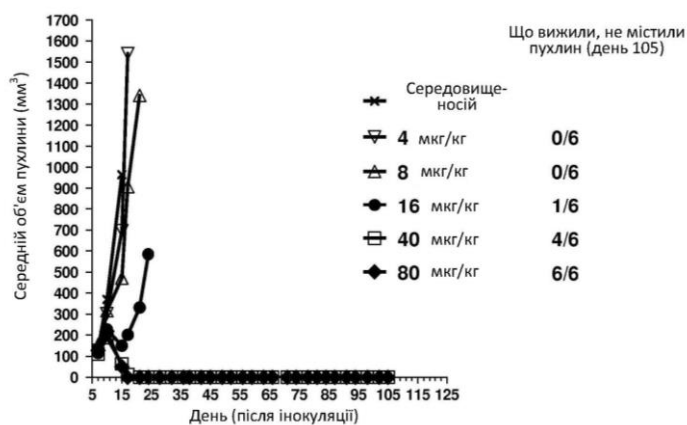
Фіг. 22

Порівняльна антипроліферативна активність (А) chB38.1-SPDB-1f та (Б) chB38.1-сульфо-SPDB-1f проти клітин CQL0205 (Ag<sup>+</sup>)



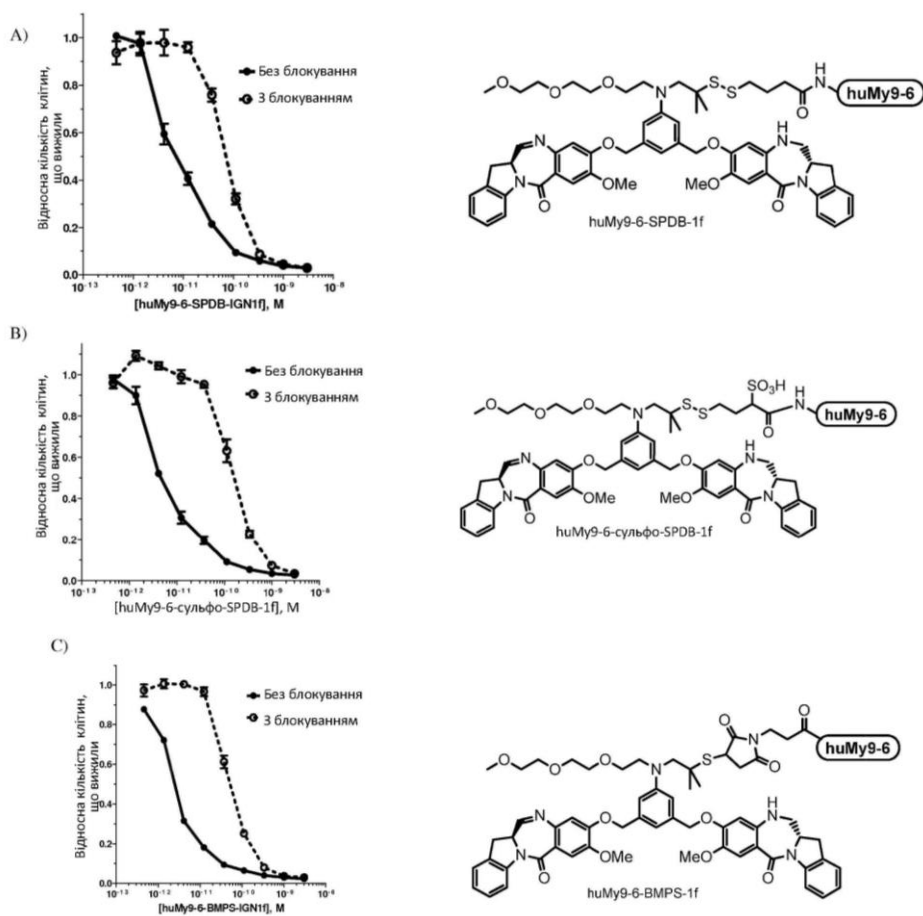
Фіг. 23

Ефективність huMy9-6-SPDB-1F in vivo на мишах, що несуть пухлини HL60/QC



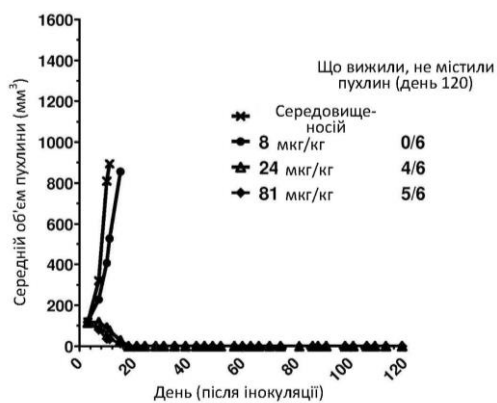
Фіг. 24

Порівняльна антипроліферативна активність (А) huMy9-6-SPDB-1f, (Б) huMy9-6-сульфо-SPDB-1f, та (В) huMy9-6-BMPS-1f проти клітин OCI-AML3 (Ag+) з та без блокування антигензв'язуючих сайтів



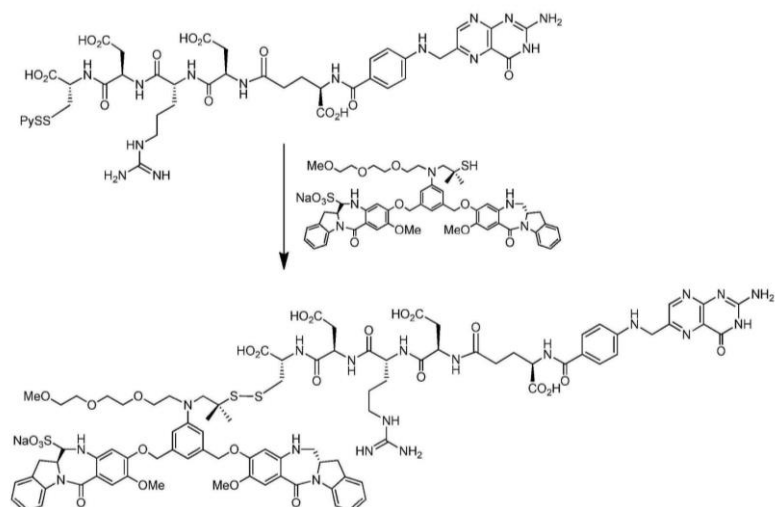
Фіг. 25

Ефективність huMy9-6-BMPS-1f in vivo на мишах, що несуть пухлини MOLM-13



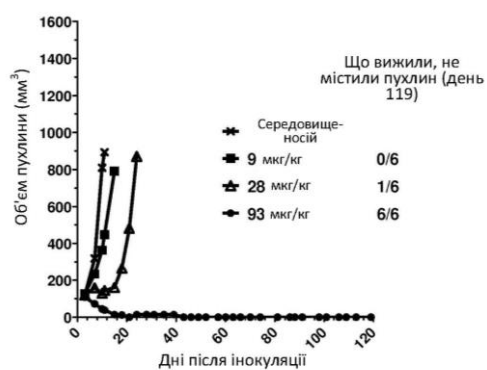
Фіг. 26

Типова схема синтезу кон'югата сульфований фолат / цитотоксичне з'єднання

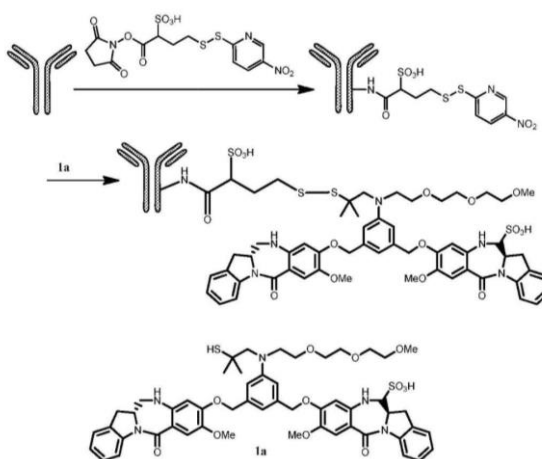


Фіг. 27

Ефективність huMy9-6-лікарський засіб 2 in vivo на мишах, що несуть пухлини MOLM-13



Фіг. 28



---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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