



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119327** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
C07D 309/32 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 13041	(72) Винахідник(и): Куевас Марчанте Кармен (ES), Домінгес Корреа Хуан Мануель (ES), Франсесч Сольосо Андрес (ES), Гаррансо Гарсія-Ібаррола Марія (ES), Мунос Алонсо Марія Хосе (ES), Санчес Мадрид Франсиско (ES), Сапата Ернандес Хуан Мануель (ES), Гарсія Арройо Алісія (ES), Урса Печарроман Марія Анхелес (ES)
(22) Дата подання заявки: 02.06.2014	(73) Власник(и): ФАРМА МАР, С.А., Poligono Industrial La Mina, Avda. de los Reyes, 1, Colmenar Viejo, E-28770 Madrid, Spain (ES)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.06.2019	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1309807.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007144423 A1, 21.12.2007 WO 2009080761 A1, 02.07.2009 EP 1864682 A1, 12.12.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 31.05.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.04.2016, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2019, Бюл.№ 11	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2014/061392, 02.06.2014	

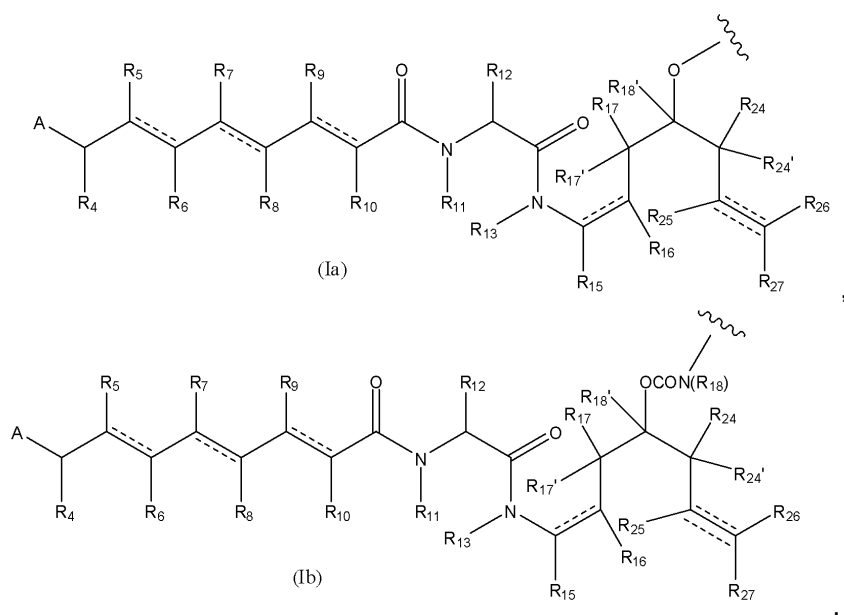
(54) КОН'ЮГАТИ АНТИТІЛА З ЛІКАРСЬКИМ ЗАСОБОМ

(57) Реферат:

Кон'югати лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$, де:

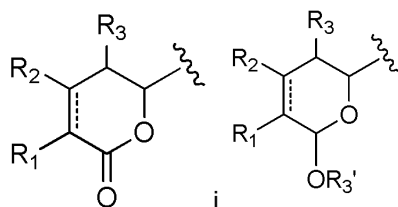
D означає групу, що являє собою лікарський засіб, вибраний з формул (Ia) і (Ib), або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:

UA 119327 C2



де

А вибраний з



R_1 , R_2 і R_3 являють собою H, OR_a , $OCOR_a$, $OCOOR_a$, алкіл, алкеніл, алкініл і т. д.; R_3' являє собою COR_a , $COOR_a$, $CONR_aR_b$ і т. д.; кожний з R_4 - R_{10} і R_{12} являє собою алкіл, алкеніл або алкініл; R_{11} являє собою H, COR_a , $COOR_a$, алкіл, алкеніл або алкініл, або R_{11} і $R_{12}+N+C$ -атоми, з якими вони зв'язані, можуть утворювати гетероциклічну групу; кожний з R_{13} і R_{14} являє собою H, COR_a , $COOR_a$, алкіл, алкеніл або алкініл; кожен R_a і R_b являє собою H, алкіл, алкеніл, алкініл і т. д.;

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок;

X являє собою розширювальну групу; AA являє собою амінокислотну ланку; L являє собою лінкерну групу; w має значення від 0 до 12; b має значення 0 або 1; Ab являє собою компонент, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і n являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$ до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться у діапазоні від 1 до 20, є корисними для лікування раку.

ГАЛУЗЬ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується нових кон'югатів лікарського засобу, лікарських лінкерних сполук, способів їх одержання, фармацевтичних композицій, що містять зазначені кон'югати лікарського засобу, і їх використання як протипухлинних засобів.

5 ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Міжнародні публікації №№ WO-A-2007/144423 і WO-A-2009/080761 розкривають нові дигідропіран-2-онові і тетрагідропіран-2-онові похідні, які демонструють дуже перспективну протипухлинну активність. РМ060184, розкритий у WO-A-2007/144423, на даний час знаходиться у Фазі I клінічних випробувань для профілактики і лікування солідних пухлин.

10 Лікування раку помітно просунулося в останні роки з розвитком фармацевтичних засобів, що таргетують і убивають ракові клітини більш ефективно. Дослідники використовували перевагу клітинно-поверхневих рецепторів і антигенів, селективно експресованих клітинами-мішенями, такими як ракові клітини, для розробки фармацевтичних засобів, основаних на антитілах, що зв'язуються, наприкладі пухлин, з пухлиноспецифічними або пухлиноасоційованими антигенами. Для того, щоб цього домогтися, здійснили хімічне зв'язування цитотоксичних молекул, таких як хіміотерапевтичні лікарські засоби, бактерії і рослинні токсини і радіонукліди, з моноклональними антитілами, які зв'язуються з пухлиноспецифічними або пухлиноасоційованими антигенами клітинної поверхні (див., наприклад, міжнародні заявки на патент WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533 і WO-A-2007/024536). Такі сполуки звичайно називають "кон'югатами" лікарських засобів, токсинів і радіонуклідів. Загибель пухлинної клітини відбувається при зв'язуванні кон'югата лікарського засобу з пухлинною клітиною і вивільненні і/або активації цитотоксичної активності компонента лікарського засобу. Селективність, забезпечувана кон'югатами лікарського засобу, мінімізує токсичність для нормальних клітин, тим самим підвищуючи переносимість лікарського засобу пацієнтом. Три приклади кон'югатів антитіла з лікарським засобом даного типу, які одержали дозвіл для продажу на ринку, являють собою: Гемтузумаб озогаміцин для гострого мієлобластного лейкозу, Брентуксимаб ведотин для рецидивуючої і рефрактерної лімфоми Ходжкіна й анапластичної великоклітинної лімфоми, і адо-Трастузумаб емтансин для раку молочної залози, зокрема HER2+.

Ефективність лікарських засобів для хіміотерапії раку, як правило, спирається на відмінності у швидкості росту, біохімічних шляхах і фізіологічних особливостях між пухлинними і нормальними тканинами. Отже, більшість стандартних хіміотерапевтичних засобів є відносно неспецифічними і виявляють дозообмежувальну токсичність, яка сприяє субоптимальним терапевтичним ефектам. Одним підходом до вибіркового таргетування злоякісних клітин, а не здорових тканин, є використання специфічних моноклональних антитіл (mAbs), що розпізнають пухлиноасоційовані антигени, експресовані на поверхні пухлинних клітин [Meyer D.L. & Senter P.D. (2003), Recent advances in antibody drug conjugates for cancer therapy. Annu. Rep. Med. Chem., 38, 229-237; Chari R.V. (2008), Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Acc. Chem. Res. 41, 98-107]. mAbs і похідні на даний час є найбільш швидкозростаючим класом терапевтичних молекул. Більше ніж 30 імуноглобулінів G-типу (IgG) і споріднені засоби були схвалені за останні 25 років в основному для ракових і запальних захворювань. В онкології, mAbs часто об'єднують з цитотоксичними лікарськими засобами для підвищення їх терапевтичної ефективності. Альтернативно, невеликі антинеопластичні молекули можуть бути хімічно кон'юговані з mAbs і використовуватися і як носії (збільшений період напіврозпаду), і як таргетуючі засоби (селективність). Значні зусилля були спрямовані на використання моноклональних антитіл (mAbs) для цільової доставки лікарського засобу, завдяки їх високим селективностям відносно пухлиноасоційованих антигенів, сприятливим фармакокінетичним властивостям і їх відносно низькій власній токсичності. Кон'югати mAb-лікарський засіб (ADCs) одержують шляхом ковалентного зв'язування протиракових лікарських засобів з mAbs, звичайно через умовно стабільну лінкерну систему. При зв'язуванні з антигенами клітинної поверхні, mAbs, використовувані для більшості ADCs, активно транспортуються в лізосоми або інші внутрішньоклітинні компартменти, де ферменти, низький рівень рН або відновники полегшують вивільнення лікарського засобу.

Антигени повинні мати високу селективність відносно пухлинної клітини для обмеження токсичності і побічних ефектів. Множина пухлиноасоційованих антигенів була вивчена в передклінічних моделях і в клінічних випробуваннях, включаючи антигени, надекспресовані у В-клітинах (наприклад, CD20, CD22, CD40, CD79), Т-клітинах (CD25, CD30), ракових клітинах (HER2, EGFR, EpCAM, EphB2, PSMA), ендотеліальних (ендогліні) або стромальних клітинах (фібробластний активований білок), для прикладу Teicher B.A. Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets, 9(8):982-1004, 2009. Головна і важлива властивість для ADC-мішеней є їх здатність до інтерналізації; це може бути невід'ємною рисою антигену як такого або може

бути викликано зв'язуванням антитіла з його антигеном. Дійсно, інтерналізація ADC є критичною для зниження токсичності, пов'язаної з позаклітинною доставкою корисного навантаження лікарського засобу.

Що стосується кон'югованих малих молекул, і на відміну від величезної різноманітності передбачуваних антигенів-мішеней, обмежена кількість сімейств цитотоксичних лікарських засобів, використовуваних як корисні навантаження в ADCs, на даний час активно досліджується в клінічних випробуваннях: каліхіміцин (Pfizer), дуокарміцини (Synthon), піролобензодіазепіни (Spirogen), іринотекан (Immunomedics), майтанзиноїди (DM1 і DM4; ImmunoGen+Genentech/Roche, Sanofi-Aventis, Biogen Idec, Centocor/Johnson & Johnson, Millennium/Takeda) і ауристатини (MMAE і MMAF; Seattle Genetics+Genentech/Roche, MedImmune/AstraZeneca, Bayer-Schering, Celldex, Progenics, Genmab). Каліхіміцин, дуокарміцини і піролобензодіазепіни являють собою засоби, що зв'язуються з малою борозенкою ДНК, іринотекан являє собою інгібітор Топоізомерази I, а майтанзиноїди й ауристатини являють собою деполімеризуючі тубулін засоби. Однією з їх загальних характерних рис є їх висока ефективність вільного лікарського засобу (від 10-9 до 10-11 M) у порівнянні, наприклад, з доксорубіцином (10-7 M), використовуваним в ADCs першого покоління. Іншим ключовим елементом успіху є чітке знання "припустимого" положення для приєднання лінкера, що сприяє вивільненню активних метаболітів, аналогічних традиційним пролікам.

Цікаво, що представник трьох цих ADCs, що містять цитотоксичний засіб, досяг пізньої стадії клінічних випробувань. Трастузумаб емтансин (T-DM1), трастузумаб, зв'язаний з майтанзиноїдним напівсинтетичним лікарським засобом за допомогою стабільного лінкера (схвалений Управлінням по контролю за продуктами і ліками від 22 лютого 2013 року для прогресуючого HER2-позитивного раку молочної залози); Інотузумаб озогаміцин (CMC-544), гуманізоване анти-CD22 mAb (G5/44, IgG4), кон'юговане з каліхіміцином з використанням кислотолабільного лінкера (ацетилфеноксипутановий) (В-клітинна неходжкінська лімфома); Брентуксимаб ведотин, гуманізоване анти-CD30 mAb, зв'язане з монометилауристатином Е (MMAE) через малеїмідкапроїл-валіл-цитрулініл-пара-амінобензилкарбаматний лінкер (схвалений Управлінням по контролю за продуктами і ліками від 19 серпня 2011 року для анапластичної великоклітинної лімфоми і лімфоми Ходжкіна).

Лінкери являють собою ключовий компонент ADC-структур. Були досліджені декілька класів лінкерів другого покоління, включаючи кислотно-лабільні гідразонові лінкери (лізосоми) (наприклад, гемтузумаб і інотузумаб озогаміцин); лінкери на дисульфідній основі (відновне внутрішньоклітинне середовище); нерозщеплювані тіоефірні лінкери (катаболічна деградація в лізосомах) (наприклад, трастузумаб емтансин); пептидні лінкери (наприклад, цитрулін-валін) (лізосомальні протеази подібні до катепсину-В) (наприклад, брентуксимаб ведотин): див., наприклад, WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533 і WO-A-2007/024536. Також було описане очищення кон'югатів антитіла з лікарським засобом за допомогою ексклюзійної хроматографії (EX) [див., наприклад, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93:8618-8623 (1996), і Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)].

Трастузумаб (Герцептин) являє собою моноклональне антитіло, що перехресно реагує з HER2/neu-рецептором. В основному, його застосовують для лікування деяких видів раку молочної залози. HER-рецептори являють собою білки, які вбудовані в клітинну мембрану і передають молекулярні сигнали зовні клітини (молекули, називані EGFs) усередину клітини, і включають і виключають гени. HER-білки стимулюють клітинну проліферацію. У деяких видах ракових захворювань, особливо в деяких видах раку молочної залози, HER2 надекспресується і змушує ракові клітини розмножуватися безконтрольно.

Ген HER2 ампліфікується в 20-30 % ранніх стадій раку молочної залози, що змушує його надекспресувати рецептори епідермального фактора росту (EGF) у клітинній мембрані. У деяких видах ракових захворювань, HER2 може посилювати сигнали без появи факторів росту і зв'язування з рецептором, що робить його ефект у клітині суттєвим; однак Трастузумаб не ефективний у цьому випадку.

HER2-шлях стимулює клітинний ріст і поділ, коли він нормально функціонує; однак, коли він надекспресується, клітинний ріст прискорюється понад його нормальні межі. У деяких видах ракових захворювань цей шлях використовується для стимулювання швидкого клітинного росту і проліферації і, отже, утворення пухлин. У ракових клітинах HER2-білок може експресуватися до 100 разів більше, ніж у нормальних клітинах (2 мільйони в порівнянні з 20000 на клітину). Ця надекспресія приводить до сильної і постійної проліферативної сигнальної активності і, отже, утворення пухлин. Надекспресія HER2 також викликає дезактивацію контрольних точок, допускаючи навіть більше збільшення проліферації.

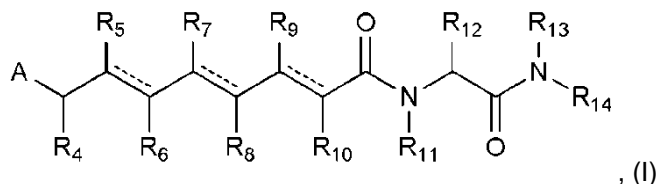
Суть винаходу

Існує необхідність у нових активних кон'югатах лікарського засобу, що не основані на сімействах цитотоксичних лікарських засобів, використовуваних як корисне навантаження на сьогоднішній день. Даний винахід задовольняє цю потребу. Він також забезпечує нові лікарські

лінкерні сполуки для використання в одержанні кон'югатів лікарського засобу за даним винаходом, способи одержання нових кон'югатів лікарського засобу за даним винаходом, фармацевтичні композиції, що містять зазначені кон'югати лікарського засобу, і їх застосування як протипухлинних засобів, а також набір, що містить кон'югат лікарського засобу за даним винаходом, для використання при лікуванні раку.

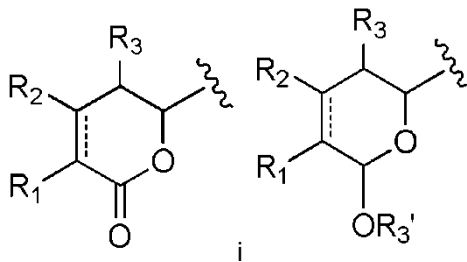
У першому аспекті даного винаходу представлений кон'югат лікарського засобу, що містить групу лікарського засобу, ковалентно зв'язану з іншою частиною кон'югата лікарського засобу, при цьому така сполука має формулу $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$, де:

D означає групу, яка являє собою лікарський засіб, що має наступну формулу (I)



або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

A вибраний з



кожний з R_1 , R_2 і R_3 незалежно вибраний з водню, OR_a , $OCOR_a$, $OCOOR_a$, NR_aR_b , NR_aCOR_b , $NR_aC(=NR_a)NR_aR_b$, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу і заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_3' вибраний з водню, COR_a , $COOR_a$, $CONR_aR_b$, $S(O)R_a$, SO_2R_a , $P(O)(R_a)R_b$, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу і заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний із групи, що складається з водню, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу і заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_{11} вибраний із групи, що складається з водню, COR_a , $COOR_a$, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу і заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу, або R_{11} і R_{12} разом з відповідним атомом N і атомом C, з якими вони зв'язані, можуть утворювати 5-14-членну заміщену або незаміщену ненасичену або насичену гетероциклічну групу, яка містить одне або декілька кілець і необов'язково містить один або декілька додаткових гетероатомів, вибраних з атомів кисню, азоту і сірки, у зазначеному кільці (кільцях), на доповнення до атома азоту групи NR_{11} , де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{13} і R_{14} незалежно вибраний із групи, що складається з водню, COR_a , $COOR_a$, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу і заміщеного або незаміщеного C_4-C_{12} -алкенінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_a і R_b незалежно вибраний із групи, що складається з водню, заміщеного або незаміщеного C_1-C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкенілу, заміщеного або незаміщеного C_2-C_{12} -алкінілу, заміщених або незаміщених арильних груп, які містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, і 5-14-членних заміщених або незаміщених

ненасичених або насичених гетероциклічних груп, які містять одне або декілька кілець, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

замісники R_x вибрані з групи, яка включає C_1 - C_{12} -алкільні групи, що можуть бути необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , C_2 - C_{12} -алкенільні групи, що можуть бути
 5 необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , C_2 - C_{12} -алкінільні групи, що можуть бути необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , атоми галогену, оксогрупи, тіогрупи, ціаногрупи, нітрогрупи, OR_y , $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, $S(O)R_y$, SO_2R_y , $P(O)(R_y)OR_z$, NR_yR_z , NR_yCOR_z , $NR_yC(=O)NR_yR_z$, $NR_yC(=NR_y)NR_yR_z$, арильні групи, що містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, які можуть бути
 10 необов'язково заміщені одним або декількома замісниками, що можуть бути однаковими або відмінними один від одного, вибраними з групи, що включає R_y , OR_y , $OCOR_y$, $OCOOR_y$, NR_yR_z , NR_yCOR_z і $NR_yC(=NR_y)NR_yR_z$, аралкільні групи, які містять алкільну групу, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, заміщену необов'язково заміщеною арильною групою, як визначено вище, аралкілоксигрупи, які містять алкоксигрупу, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, заміщену
 15 необов'язково заміщеною арильною групою, як визначено вище, і 5-14-членну насичену або ненасичену гетероциклічну групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена гетероциклічна група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_y , і де більше ніж один необов'язковий замісник присутній на будь-якій даній групі, такі необов'язкові замісники
 20 R_y можуть бути однаковими або відмінними один від одного;

кожен R_y і R_z незалежно вибраний із групи, що включає водень, C_1 - C_{12} -алкільні групи, C_1 - C_{12} -алкільні групи, що заміщені щонайменше одним атомом галогену, аралкільні групи, що включають C_1 - C_{12} -алкільну групу, яка заміщена арильною групою, що містить від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, і гетероциклоалкільні групи, що включають C_1 - C_{12} -алкільну групу, яка заміщена 5-14-членною ненасиченою або насиченою гетероциклічною
 25 групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях);

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок;

кожна хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання групи А до іншої частини групи
 30 лікарського засобу;

X являє собою розширювальну групу;

кожен AA незалежно являє собою амінокислотну ланку;

L являє собою лінкерну групу;

w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

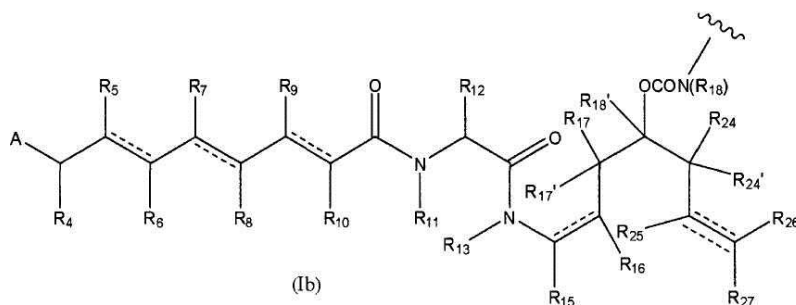
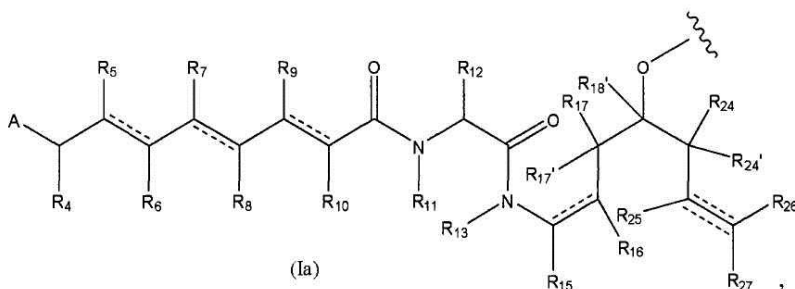
35 b являє собою ціле число, що має значення 0 або 1;

Ab являє собою компонент, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт; і

n являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$ до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 1 до 20.

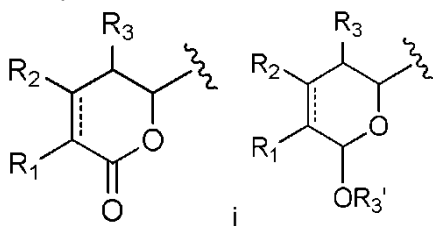
Як пояснюється і проілюстровано більш докладно нижче, кон'югати лікарських засобів
 40 формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$ за даним винаходом являють собою прорив у вирішенні описаних вище проблем, що вимагають додаткових кон'югатів лікарських засобів на доповнення до тих, що оснований на трьох основних сімействах цитотоксичних лікарських засобів, які використовувалися як корисні навантаження дотепер, що демонструють чудову протипухлинну активність.

45 У переважному варіанті втілення першого аспекту даного винаходу представлений кон'югат лікарського засобу за пунктом 1 формули винаходу або його фармацевтично прийнятна сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де D означає групу, що являє собою лікарський засіб, вибраний з формул (Ia) і (Ib):



де хвилясті лінії формули (Ia) і (Ib) вказують точку ковалентного приєднання до (X)_b, якщо це має місце, або до (AA)_w, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

A вибраний з



де хвилясті лінії групи A вказують місце ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

кожний з R₁, R₂, R₃, R_{3'}, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R_a, R_b, R_x, R_y і R_z має значення, визначене в першому аспекті даного винаходу;

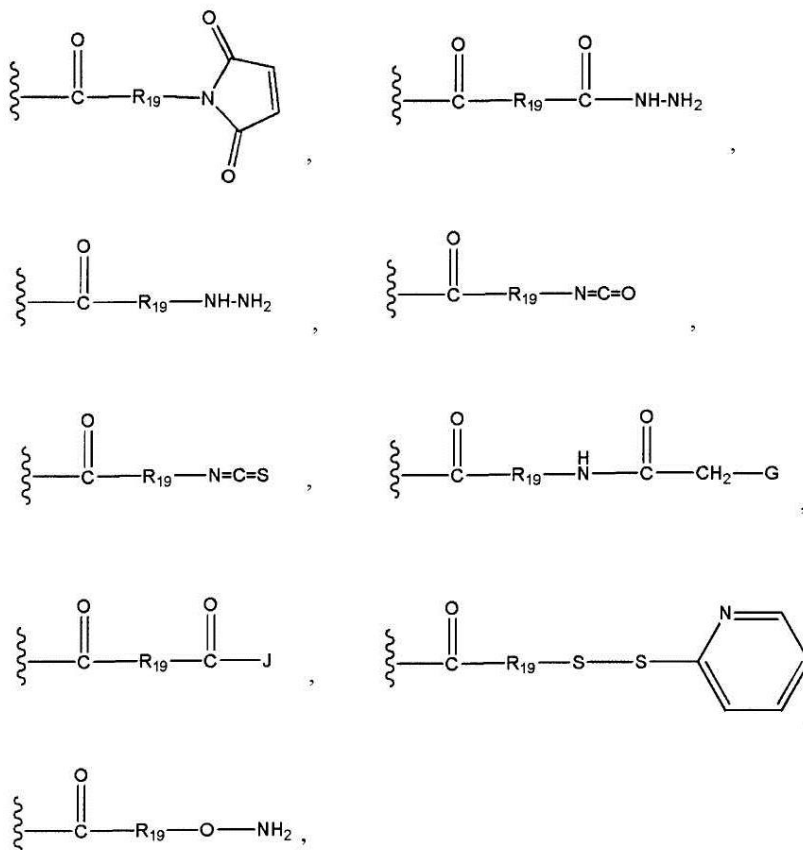
кожний з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R_{17'}, R₁₈, R₂₄, R_{24'}, R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що включає водень, заміщений або незаміщений C₁-C₁₂-алкіл, заміщений або незаміщений C₂-C₁₂-алкеніл і заміщений або незаміщений C₂-C₁₂-алкініл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

R₁₈ вибраний із групи, що включає водень, C₁-C₁₂-алкільні групи, що необов'язково можуть бути заміщені щонайменше однією групою R_x, арильні групи, які містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, і 5-14-членні заміщені або незаміщені ненасичені або насичені гетероциклічні групи, що містять одне або декілька кілець, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

R₂₇ вибраний з водню, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₂-алкілу і галогену; і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R₂₅, і атомом C, до якого приєднані R₂₆ і R₂₇, тоді R₂₅ і або R₂₆, або R₂₇ відсутні.

В другому аспекті даного винаходу представлена сполука формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H, де:

L₁ являє собою лінкер, вибраний із групи формул, що включає:



кожна з хвилястих ліній указує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до X;

G вибраний з галогену, -O-мезилу і -O-тозилу;

5 J вибраний з галогену, гідрокси, -N-сукцинімідокси, -O-(4-нітрофенілу), -O-пентафторфенілу, -O-тетрафторфенілу і -O-C(O)-OR₂₀;

10 R₁₉ вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -C₃-C₈-карбоцикло-, -O-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₈-арилу в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-C₆-C₁₈-арилу-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₈-арилу-C₁-C₁₂-алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-, -(C₃-C₈-карбоцикло)-C₁-C₁₂-алкілену-, -C₅-C₁₄-гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₅-C₁₄-гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -(OCH₂CH₂)_r- і -CH₂-(OCH₂CH₂)_r-, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x;

20 R₂₀ являє собою C₁-C₁₂-алкіл або арильну групу, що містить від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x;

г являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10; і

кожний з D, X, AA і w має значення, визначене в першому аспекті даного винаходу.

У третьому аспекті даного винаходу представлений кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу для використання як лікарського препарату.

У четвертому аспекті даного винаходу представлений кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу для використання в лікуванні раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчника. Найбільш переважно рак вибраний з колоректального раку, раку молочної залози, лейкозу, лімфоми і раку яєчника.

У п'ятому аспекті даного винаходу представлена фармацевтична композиція, що містить кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій.

У шостому аспекті даного винаходу представлений спосіб профілактики або лікування раку, який включає введення ефективної кількості кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу потребуючому цього пацієнту. Переважно рак вибраний з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчника. Найбільш переважно рак вибраний з колоректального раку, раку молочної залози, лейкозу, лімфоми і раку яєчника.

У сьомому аспекті даного винаходу представлене застосування кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу для одержання лікарського препарату для лікування раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчника. Найбільш переважно рак вибраний з колоректального раку, раку молочної залози, лейкозу, лімфоми і раку яєчника.

У восьмому аспекті даного винаходу представлений набір, який містить терапевтично ефективну кількість кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій. Набір призначений для використання при лікуванні раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчника. Найбільш переважно рак вибраний з колоректального раку, раку молочної залози, лейкозу, лімфоми і раку яєчника.

У дев'ятому аспекті даного винаходу представлений спосіб одержання кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу, який включає кон'югування компонента Ab, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і лікарського засобу D формули (I), (Ia) або (Ib), де Ab і D мають значення, визначені в першому аспекті даного винаходу.

Докладний опис переважних варіантів втілення

У сполуках за даним винаходом, алкільні групи у визначеннях замісників $R_1, R_2, R_3, R_3', R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{17}', R_{18}, R_{18}', R_{20}, R_{24}, R_{24}', R_{25}, R_{26}, R_{27}, R_a, R_b, R_x, R_y$ і R_z можуть являти собою алкільну групу з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, і вони переважно являють собою алкільну групу, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю, більш переважно метильну групу, етильну групу або ізопропильну групу, найбільш переважно метильну групу. У визначеннях замісників M і Q, вони можуть являти собою алкільну групу з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю.

У сполуках за даним винаходом, алкенільні групи у визначеннях замісників $R_1, R_2, R_3, R_3', R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{17}', R_{18}, R_{18}', R_{24}, R_{24}', R_{25}, R_{26}, R_a, R_b$ і R_x є розгалуженими або нерозгалуженими і можуть містити один або декілька подвійних зв'язків і від 2 до 12 атомів вуглецю. Переважно вони містять від 2 до 6 атомів вуглецю, більш переважно вони являють собою розгалужені або нерозгалужені алкенільні групи, що містять 2, 3 або 4 атоми вуглецю.

У сполуках за даним винаходом, алкінільні групи у визначеннях замісників $R_1, R_2, R_3, R_3', R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{17}', R_{18}', R_{24}, R_{24}', R_{25}, R_{26}, R_a, R_b$ і R_x є розгалуженими або нерозгалуженими і можуть містити один або декілька потрійних зв'язків і від 2 до 12 атомів вуглецю. Переважно вони містять від 2 до 6 атомів вуглецю, більш переважно вони являють собою розгалужені або нерозгалужені алкінільні групи, що містять 2, 3 або 4 атоми вуглецю.

У сполуках за даним винаходом, алкенінільні групи у визначеннях замісників R_{13} і R_{14} є розгалуженими або нерозгалуженими і можуть містити один або декілька подвійних зв'язків і один або декілька потрійних зв'язків. Переважно вони містять від 4 до 12 атомів вуглецю, більш переважно вони являють собою розгалужені або нерозгалужені алкінільні групи, що містять від 6 до 10 атомів вуглецю.

У сполуках за даним винаходом галогенові замісники у визначеннях замісників R_{27} , R_x , R_y і R_z включають F, Cl, Br і I, переважно Cl.

У сполуках за даним винаходом 5-14-членні насичені або ненасичені гетероциклічні групи у визначеннях замісників R_x , R_a , R_b , R_{18} і гетероциклічні групи, що можуть бути утворені групами R_{11} і R_{12} разом з атомом азоту й атомом вуглецю, до яких вони приєднані, являють собою гетероциклічні групи, які містять одне або декілька кілець, що містять щонайменше один атом кисню, азоту або сірки, у зазначеному кільці (кільцях). Гетероциклічні групи являють собою групи, які можуть бути гетероароматичними групами або гетероаліциклічними групами, останні з яких можуть бути частково ненасиченими, і як ароматичними, так і аліциклічними гетероциклічними групами, що містять від 1 до 3 окремих або конденсованих кілець. Переважно гетероароматичні і гетероаліциклічні групи містять від 5 до 10 кільцевих атомів. Придатні гетероароматичні групи в сполуках за даним винаходом містять один, два або три гетероатоми, вибрані з атомів N, O або S, і включають, наприклад, хінолін, включаючи 8-хінолін, ізохінолін, кумариніл, включаючи 8-кумариніл, піридил, піразиніл, піразоліл, піримідиніл, фурил, піроліл, тієніл, тіазоліл, ізотіазоліл, триазоліл, тетразоліл, ізоксазоліл, оксазоліл, імідазоліл, індоліл, ізоіндоліл, індазоліл, індолізиніл, фталазиніл, птеридиніл, пуриніл, оксадіазоліл, тіадіазоліл, фуразаніл, піридазиніл, триазиніл, цинолініл, бензімідазоліл, бензофураніл, бензофуразаніл, бензотіофеніл, бензотіазоліл, бензоксазоліл, хіназолініл, хіноксалініл, нафтиридиніл і фуropyридил. Придатні гетероаліциклічні групи в сполуках за даним винаходом містять один, два або три гетероатоми, вибрані з атомів N, O або S, і включають, наприклад, піролідиніл, тетрагідрофураніл, дигідрофураніл, тетрагідротієніл, тетрагідротіопіраніл, піперидил, морфолініл, тіоморфолініл, тіоксаніл, піперазиніл, азетидиніл, оксетаніл, тіетаніл, гомопіперидил, оксепаніл, тієпаніл, оксазепініл, діазепініл, тіазепініл, 1,2,3,6-тетрагідропіридил, 2-піролініл, 3-піролініл, індолініл, 2Н-піраніл, 4Н-піраніл, діоксаніл, 1,3-діоксоланіл, піразолініл, дитіаніл, дитіоланіл, дигідропіраніл, дигідротієніл, дигідрофураніл, піразолідиніл, імідазолініл, імідазолідиніл, 3-азабіцикло[3,1,0]гексил, 3-азабіцикло[4,1,0]гептил, 3Н-індоліл і хінолізиніл.

У сполуках за даним винаходом, арильні групи у визначеннях замісників R_{18} , R_{20} , R_a , R_b , і R_x являють собою кільцеві сполуки з одним або декількома кільцями, які містять окремі і/або конденсовані арильні групи і містять від 6 до 18 кільцевих атомів і є необов'язково заміщеними. Типові арильні групи містять від 1 до 3 окремих або конденсованих кілець. Переважно арильні групи містять від 6 до 12 вуглецевих кільцевих атомів. Особливо переважні арильні групи включають заміщений або незаміщений феніл, заміщений або незаміщений нафтил, заміщений або незаміщений біфеніл, заміщений або незаміщений фенантрин і заміщений або незаміщений антрин, найбільш переважний заміщений або незаміщений феніл, де замісники мають значення, зазначені вище, залежно від того, чи є арильна група одним із замісників R_{20} , R_{28} , R_a і R_b або вона являє собою замісник R_x .

У сполуках за даним винаходом, аралкільні групи у визначеннях замісників R_x , R_y і R_z включають алкільну групу, яка визначена і приклади якої представлені вище, що заміщена однією або декількома арильними групами, які визначені і приклади яких представлені вище. Переважні приклади включають необов'язково заміщений бензил, необов'язково заміщений фенілетил і необов'язково заміщений нафтилметил.

У сполуках за даним винаходом, аралкілоксигрупи у визначеннях замісників R_x включають алкоксигрупу, яка містить від 1 до 12 атомів вуглецю, що заміщена однією або декількома арильними групами, які визначені і приклади яких представлені вище. Переважно алкоксигрупа містить від 1 до 6 атомів вуглецю і арильна група містить від 6 до близько 12 вуглецевих кільцевих атомів, найбільш переважно аралкілоксигрупа являє собою необов'язково заміщений бензилокси, необов'язково заміщений фенілетокси і необов'язково заміщений нафтилметокси.

У сполуках за даним винаходом, гетероциклоалкільні групи у визначеннях замісників R_y і R_z включають алкільну групу, яка визначена і приклади якої представлені вище, що заміщена однією або декількома гетероциклічними групами, які визначені і приклади яких представлені вище. Переважно гетероциклоалкільні групи включають алкільну групу, яка містить від 1 до 6 атомів вуглецю, що заміщена гетероциклічною групою, яка містить від 5 до 10 кільцевих атомів у 1 або 2 кільцях, і може бути ароматичною, частково насиченою або повністю насиченою. Більш переважно гетероциклоалкільні групи включають метильну або етильну групу, яка заміщена гетероциклічною групою, вибраною з групи, що включає піролідиніл, імідазолідиніл, піперидиніл, піперазиніл, морфолініл, тетрагідрофураніл, тіоаніл, оксаніл, тіаніл, 8-хінолін, ізохінолін, піридил, піразиніл, піразоліл, піримідиніл, фурил, піроліл, тієніл, тіазоліл, ізотіазоліл, триазоліл, тетразоліл, ізоксазоліл, оксазоліл і бензімідазол.

У сполуках за даним винаходом, алкіленові групи у визначенні R_{19} являють собою алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 12 атомів вуглецю, і алкіленові

групи у визначеннях замісників M і X являють собою алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю. Переважно алкіленові групи у визначенні R_{19} являють собою алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 8 атомів вуглецю, більш переважно алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю. Для замісника M переважними є алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 1 до 3 атомів вуглецю. У визначенні X алкіленові групи переважно являють собою алкіленові групи з прямим або розгалуженим ланцюгом, що містять від 2 до 4 атомів вуглецю.

У сполуках за даним винаходом, карбоциклогрупи у визначеннях замісників R_{19} і M являють собою циклоалкільні групи, що містять від 3 до 8 атомів вуглецю, які містять два ковалентні зв'язки в будь-якому положенні на циклоалкільному кільці, зв'язуючи зазначену циклоалкільну групу з іншою частиною кон'югата лікарського засобу. Переважно карбоциклогрупи у визначеннях замісників R_{19} і M являють собою циклоалкільні групи, що містять від 3 до 7 атомів вуглецю, більш переважно карбоциклогрупи, що містять від 5 до 7 атомів вуглецю.

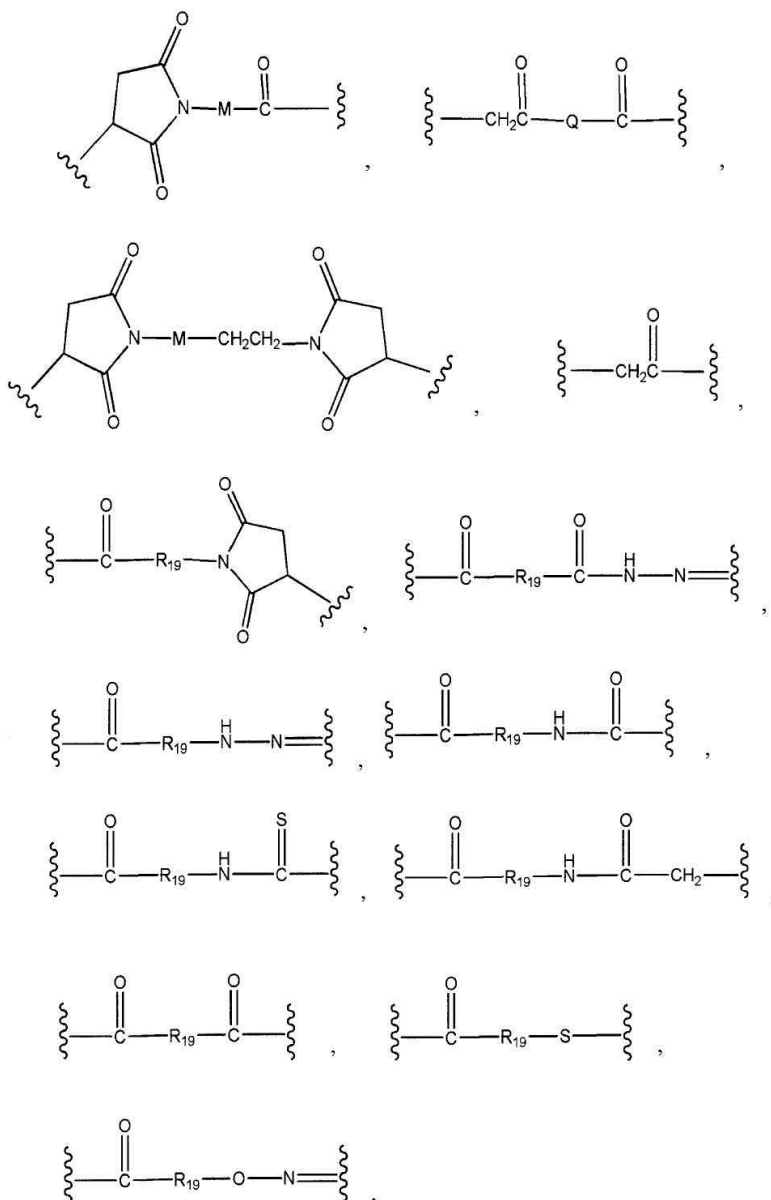
У сполуках за даним винаходом, ариленові групи у визначенні R_{19} являють собою арильні групи, що містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, які містять два ковалентні зв'язки в будь-якому положенні на ароматичній кільцевій системі, зв'язуючи зазначені ариленові групи з іншою частиною кон'югата лікарського засобу. Переважно ариленові групи у визначенні R_{19} являють собою арильні групи, що містять від 6 до 12 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, які містять два ковалентні зв'язки в будь-якому положенні на ароматичній кільцевій системі, найбільш переважно вони являють собою феніленові групи.

У сполуках за даним винаходом, гетероциклогрупи у визначенні R_{19} являють собою гетероциклільні групи, що містять від 1 до 3 окремих або конденсованих кілець, які містять від 5 до 14 кільцевих атомів і містять щонайменше один атом кисню, азоту і/або сірки у зазначеному кільці (кільцях), де присутні два ковалентні зв'язки в будь-якому положенні на кільцевій системі зазначених гетероциклічних груп. Гетероциклічні групи являють собою групи, що можуть бути гетероароматичними групами або гетероаліциклічними групами (останні можуть бути частково ненасиченими). Переважно гетероциклогрупи у визначенні R_{19} являють собою гетероциклільні групи, що містять від 1 до 3 окремих або конденсованих кілець, які містять від 5 до 12 кільцевих атомів і містять щонайменше один атом кисню, азоту і/або сірки у зазначеному кільці (кільцях), де присутні два ковалентні зв'язки в будь-якому положенні на кільцевій системі зазначених гетероциклічних груп.

У випадку присутності більше ніж одного необов'язкового замісника R_x на заміснику, кожен замісник R_x може мати однакові або відмінні один від одного значення.

Переважні кон'югати лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу включають:

кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L являє собою лінкерну групу, вибрану з групи, що включає:



де

хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до Ab (хвиляста лінія праворуч) і (AA)_w, якщо це має місце, або (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч);

5

R₁₉ вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -C₃-C₈-карбоцикло-, -O-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₈-арилену в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-C₆-C₁₈-арилену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₈-арилен-C₁-C₁₂-алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-, -(C₃-C₈-карбоцикло)-C₁-C₁₂-алкілену-, -C₅-C₁₄-гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₅-C₁₄-гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -(C₅-C₁₄-гетероцикло)-C₁-C₁₂-алкілену-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x.

10

15

20

заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(OCH_2CH_2)_r$ і $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

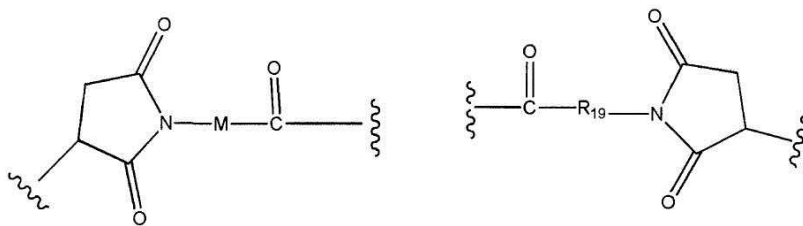
М вибраний із групи, що включає $-C_1-C_6$ -алкілен-, $-C_1-C_6$ -алкілен- $(C_3-C_8$ -карбоцикло)-, $-(CH_2CH_2O)_s$ -, $-C_1-C_6$ -алкілен- $(C_3-C_8$ -карбоцикло)-CON(H або C_{1-6} алкіл)- C_1-C_6 -алкілен-, фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x , фенілен- C_1-C_6 -алкілен-, де феніленова група може бути необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , і $-C_1-C_6$ -алкілен-CON(H або C_{1-6} алкіл)- C_1-C_6 -алкілен-;

Q вибраний із групи, що включає $-N(H$ або C_{1-6} алкіл)фенілен- і $-N(H$ або C_{1-6} алкіл)- $(CH_2)_s$;

г являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10; і

с являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10;

кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n$ -Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L вибраний із групи, що включає:



де:

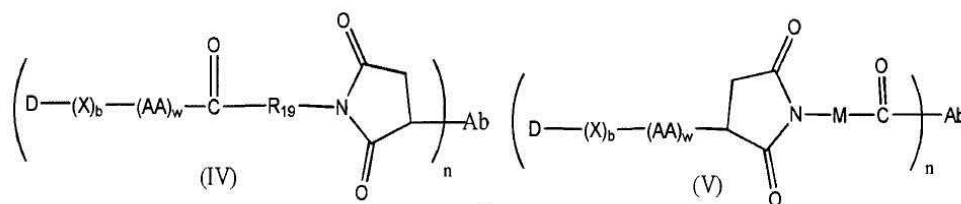
хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до Ab (хвиляста лінія праворуч) і $(AA)_w$, якщо це має місце, або $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч);

R_{19} вибраний з $-C_1-C_{12}$ -алкілену-, $-O-(C_1-C_{12}$ -алкілену), $-C_6-C_{12}$ -арилу в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}$ -алкілен- C_6-C_{12} -арилу-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_6-C_{12}$ -арилу- C_1-C_{12} -алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_5-C_{12}$ -гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}$ -алкілен- $(C_5-C_{12}$ -гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(C_5-C_{12}$ -гетероцикло)- C_1-C_{12} -алкілену-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(OCH_2CH_2)_r$ і $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ; і

М вибраний із групи, що включає $-C_1-C_6$ -алкілен-, $-C_1-C_6$ -алкілен- $(C_3-C_8$ -карбоцикло)- і фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ; і

г являє собою ціле число, що має значення від 1 до 6;

кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n$ -Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу, вибраний з формул (IV) і (V):



де:

X являє собою розширювальну групу, як визначено в першому аспекті даного винаходу;

кожен АА незалежно являє собою амінокислотну ланку, як визначено в першому аспекті даного винаходу;

5 в являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

b являє собою ціле число, що має значення 0 або 1;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб;

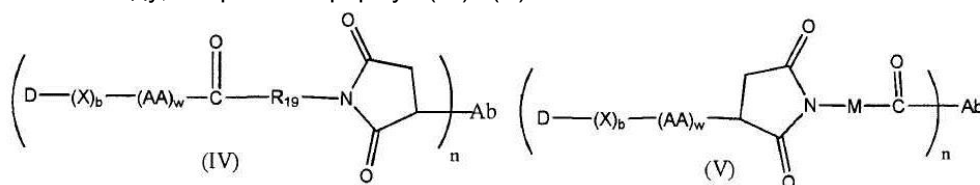
Аб являє собою компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт;

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 1 до 20;

R₁₉ вибраний з -C₁-C₈-алкілену-, -O-(C₁-C₈-алкілену), -C₁-C₈-алкілен-C₆-C₁₂-арилену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₂-арилен-C₁-C₈-алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x; i

М вибраний із групи, що включає -C₁-C₃-алкілен- і -C₁-C₃-алкілен-(C₅-C₇-карбоцикло)-;

20 кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b(AA)_w(L)_n]Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, вибраний з формул (IV) і (V):



де:

X являє собою розширювальну групу;

25 кожен АА незалежно являє собою амінокислотну ланку;

в являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

б являє собою ціле число, що має значення 0 або 1:

D означає групу, що являє собою лікарський засіб;

Аб являє собою компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт;

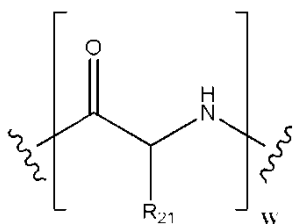
30 п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w(L)-]$, де L має значення, визначене в формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 1 до 20;

R₁₉ вибраний з -C₁-C₆-алкілену-, фенілен-C₁-C₆-алкілену-, де феніленова група може бути необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, окремо або приєднаний до іншої групи у вуглецевому ланцюзі, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, арильні групи, які містять від 6 до 12 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, переважно R₁₉ являє собою -C₁-C₆-алкіленову групу; і

М являє собою -C₁-C₃-алкілен-(C₅-C₇-карбоцикло)-;

переважно, коли у визначенні кон'югата лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w(L)_n]-Ab$ L має значення, визначене вище в переважних визначеннях для зазначеної групи, і $(AA)_w$ являє

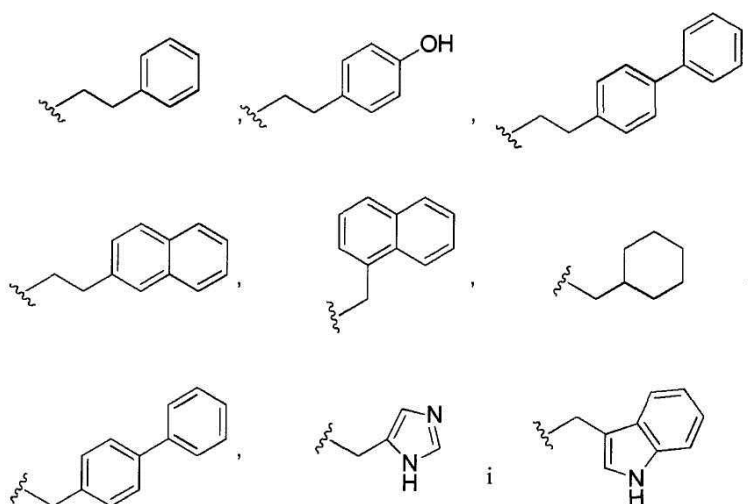
45 собою формулу (II):



(II)

де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або до групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

- 5 R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, бензил, пара-гідроксibenзил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил,



10

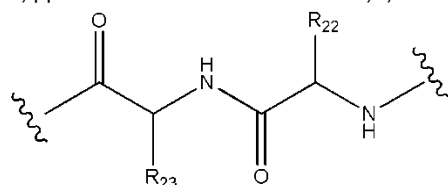
і w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

кон'югат лікарського засобу формули $[\text{D}-(\text{X})_b-(\text{AA})_w-(\text{L})-]_n-\text{Ab}$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L має значення, визначене вище в переважних визначеннях для зазначеної групи, і $(\text{AA})_w$ являє собою формулу (II) де:

- 15 R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, втор-бутил, бензил, індолілметил, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ і $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$; і

w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 6;

- 20 кон'югат лікарського засобу формули $[\text{D}-(\text{X})_b-(\text{AA})_w-(\text{L})-]_n-\text{Ab}$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L має значення, визначене вище в переважних визначеннях для зазначеної групи, де w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(\text{AA})_w$ являє собою формулу (III):



(III)

де:

- 25 хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або до групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

R_{22} вибраний з метилу, бензилу, ізопропілу, втор-бутилу і індолілметилу; і

R_{23} вибраний з метилу, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ і $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

далі, переважно, коли у визначенні кон'югата лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$, L і AA мають значення, визначені вище в переважних визначеннях для зазначених груп, і X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає:

-CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-;
5 -COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;

-CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;

-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;

-COCH₂NH-COCH₂-NH-;

-COCH₂NH-;

-CONH-(C₁-C₆-алкілен)S-;

-CONH-(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-;

15 -(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-;

-(C₁-C₆-алкілен)S-;

-(C₁-C₆-алкілен)NH-; і

-(C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;

20 кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L і AA мають значення, визначені вище в переважних визначеннях для зазначених груп, і X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає:

-CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-;

-COO-CH₂-фенілен-NH-, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи;

-CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи)-NH-;

-COCH₂NH-COCH₂-NH-;

-CONH-(C₂-C₄-алкілен)S-;

-CONH-(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-;

35 -(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-;

-(C₂-C₄-алкілен)S-;

-(C₂-C₄-алкілен)NH-; і

-(C₂-C₄-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи)-NH-;

кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу, де L і AA мають значення, визначені вище в переважних визначеннях для зазначених груп, і X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає:

45 -CONH(CH₂)₃NHCOOCH₂-фенілен-NH-;

-CONH(CH₂)₃NH-;

-CONH(CH₂)₃-S-;

-CONH(CH₂)₃NHCO(CH₂)₂S-;

-(CH₂)₃NHCO(CH₂)₂S-;

50 -(CH₂)₃S-;

-(CH₂)₃NH-; і

-(CH₂)₃NHCOOCH₂-фенілен-NH-.

Переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R₂ і R₃, кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x, більш переважно кожний з R₂ і R₃ являє собою водень.

Інший переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R_1 вибраний з водню, OR_a і $OCOR_a$, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де

необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно R_1 являє собою водень або метокси.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R_3 вибраний з водню, COR_a і заміщеного або незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де R_a являє собою заміщений або незаміщений C_1-C_6 -алкіл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно R_3 являє собою водень.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню і заміщеного і незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню, заміщеного і незаміщеного метилу, заміщеного і незаміщеного ізопропілу і заміщеного і незаміщеного трет-бутилу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x .

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожний з R_5 , R_7 , R_8 , R_9 і R_{10} являє собою водень.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожний з R_4 і R_6 являє собою метил.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-A$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R_{12} являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , AA і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожний з R_{11} і R_{13} незалежно вибраний з водню і заміщеного і незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18} , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає водень, заміщений або незаміщений C_1-C_6 -алкіл, заміщений або незаміщений C_2-C_6 -алкеніл і заміщений або незаміщений C_2-C_6 -алкініл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18} , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що складається з водню і заміщеного або незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z і NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, ще більш переважно кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18} , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно являє собою водень або C_1-C_6 -алкільну групу, найбільш переважно кожен з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18} , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} являє собою водень або метил.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)_n]-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщеною одним або декількома замісниками R_x , арильної групи, що містить від 6 до 12 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x і 5-10-членною ненасиченою або насиченою гетероциклічною групою, що містить одне або декілька кілець, при цьому зазначена гетероциклічна група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , де замісники R_x вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, атоми галогену, алкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, і діалкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, більш переважно R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x і фенільною групою, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x , найбільш переважно R_{18} являє собою водень або фенільну групу, особливо водень.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)_n]-A$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де R_{27} вибраний з атома водню, атома галогену або заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x , більш переважно R_{27} вибраний з атома водню й атома хлору.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)_n]-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де кожна пара атомів вуглецю, з'єднана однією або декількома пунктирними лініями, зв'язана за допомогою подвійних зв'язків.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)_n]-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L , $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 вибраний з водню, OR_a і $OCOR_a$, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_2 і R_3 , кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_3' вибраний з водню, COR_a і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де R_a являє собою заміщений або незаміщений C_1 - C_6 -алкіл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню і заміщеного і незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_{11} і R_{13} незалежно вибрані з водню і заміщеного і незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає:

водень і заміщені або незаміщені C_1 - C_6 -алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z і NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x , арильної групи, що містить від 6 до 12 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x і 5-10-членною ненасиченою або насиченою гетероциклічною групою, яка містить одне або декілька кілець, при цьому зазначена гетероциклічна група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , де замісники R_x вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, атоми галогену, алкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, і діалкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

R_{27} вибраний з водню, галогену і заміщеного і незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ; і

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R_{25} , і атомом C, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 являє собою водень або метокси;

кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;

R_3' являє собою водень;

кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню, заміщеного або незаміщеного метилу, заміщеного або незаміщеного ізопропілу і заміщеного або незаміщеного трет-бутилу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає:

водень і заміщені або незаміщені C_1 - C_6 -алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z і NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, що містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x , і фенільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x ;

R_{27} являє собою атом водню або атом хлору; і

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R_{25} , і атомом C, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 являє собою водень або метокси;

кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;

R_3' являє собою водень;

кожний з R_5 , R_7 , R_8 , R_9 і R_{10} являє собою водень;

кожний з R_4 і R_6 являє собою метил;

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

R_{12} являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил;

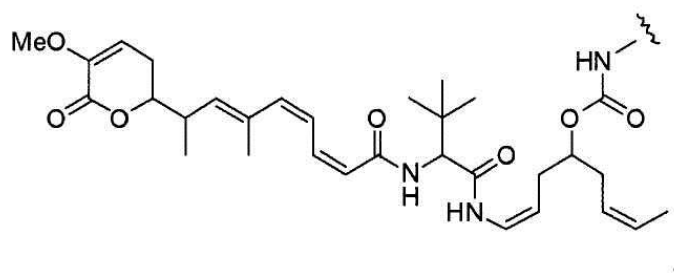
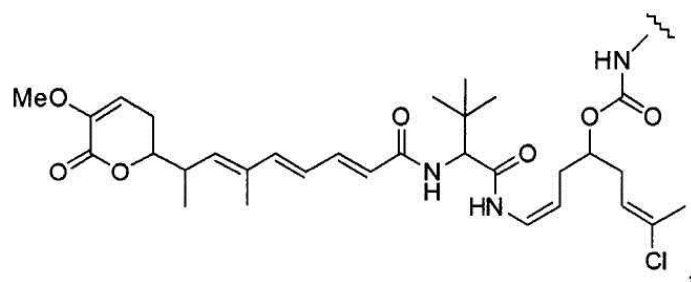
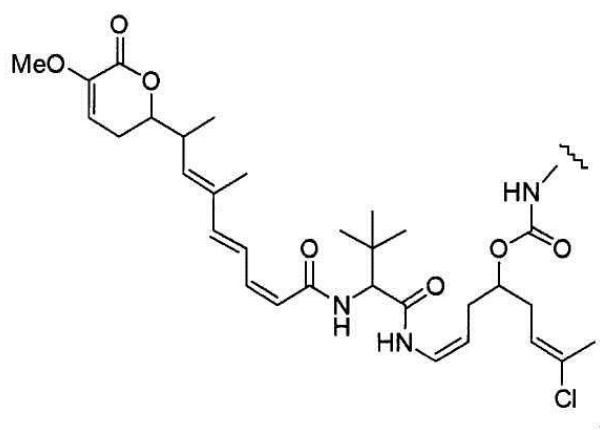
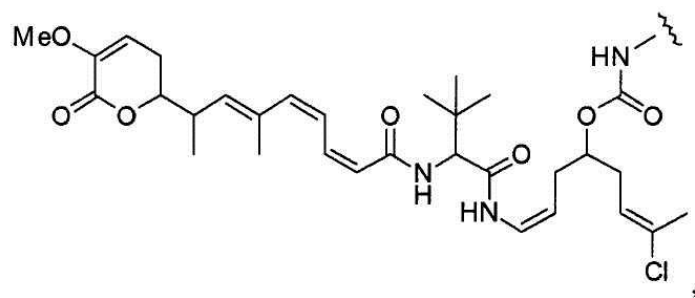
кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що складається з водню і C_1 - C_6 -алкільної групи, переважно водню і метилу;

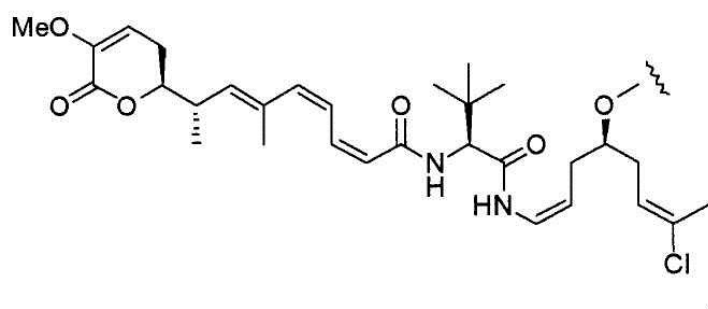
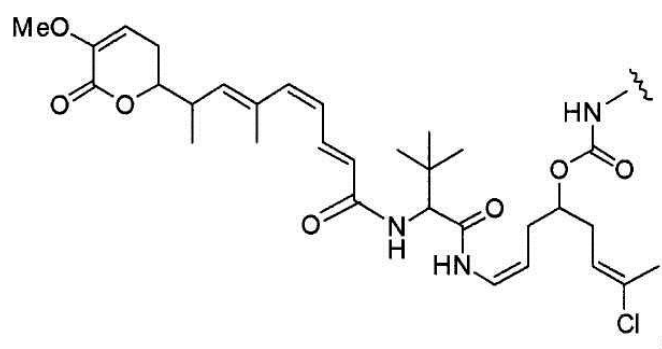
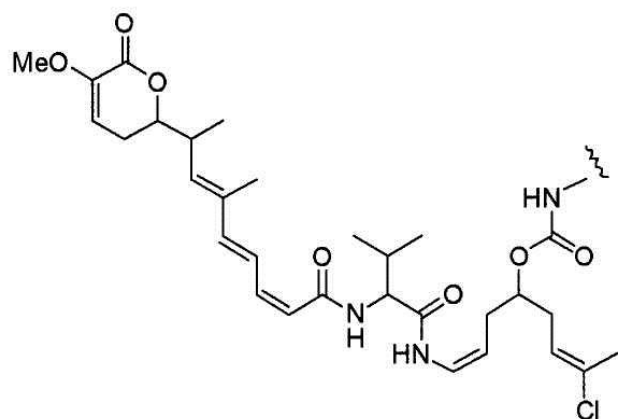
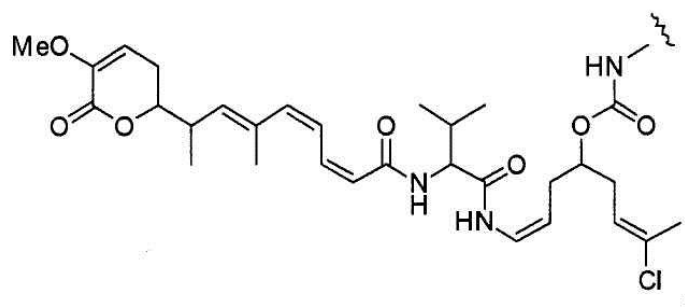
R_{18} вибраний з водню і фенілу, переважно водню;

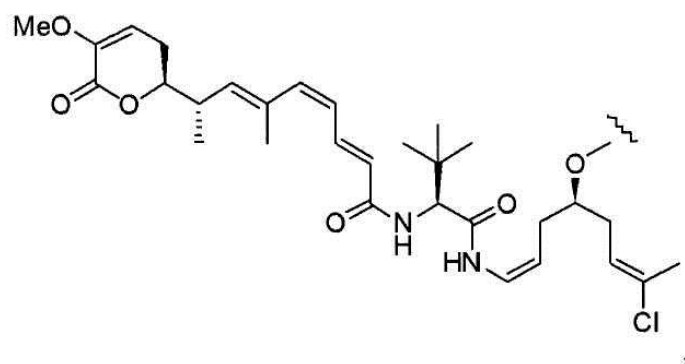
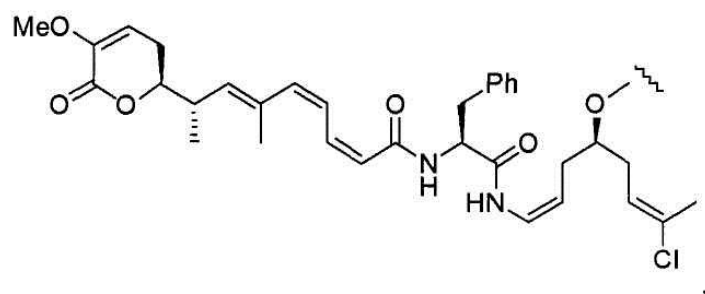
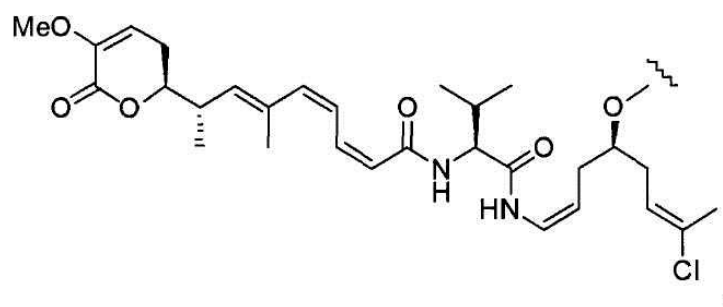
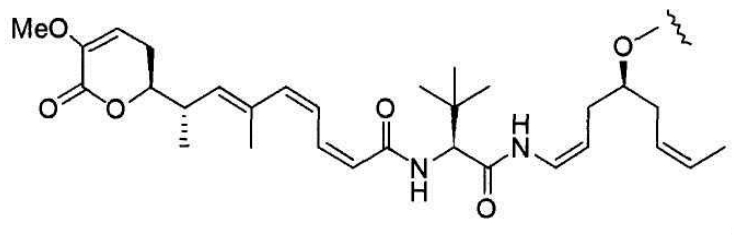
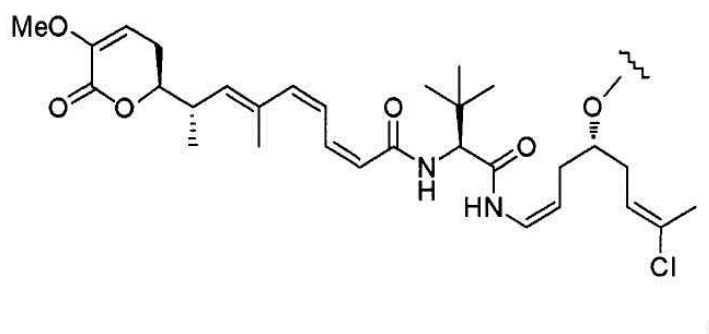
R_{27} являє собою атом водню або атом хлору; і

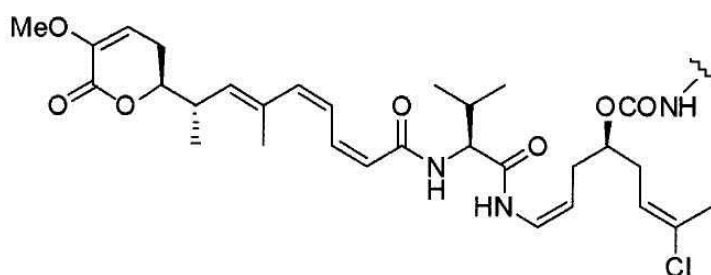
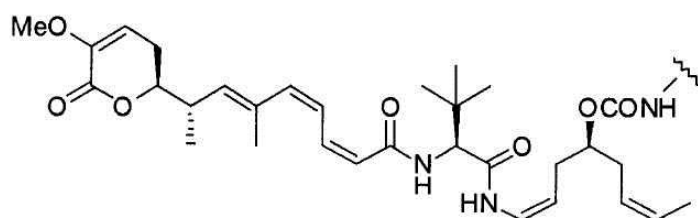
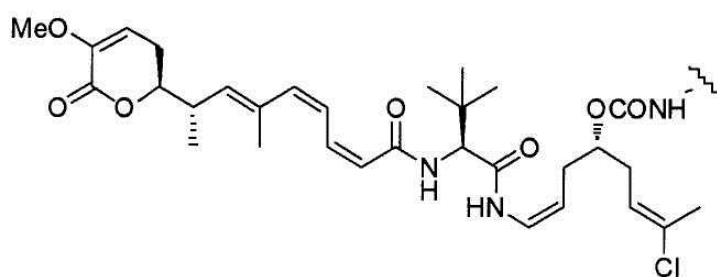
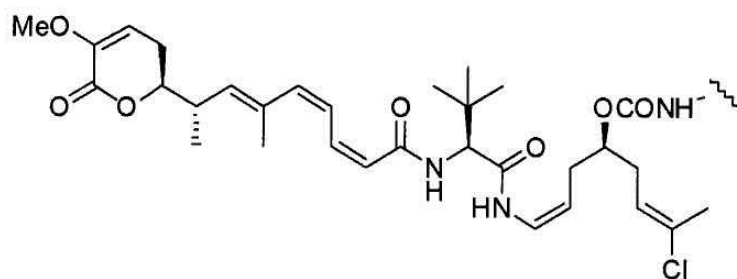
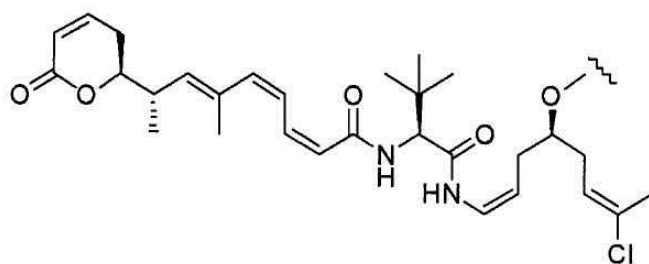
кожна пара атомів вуглецю, з'єднана однією або декількома пунктирними лініями, зв'язана через подвійні зв'язки.

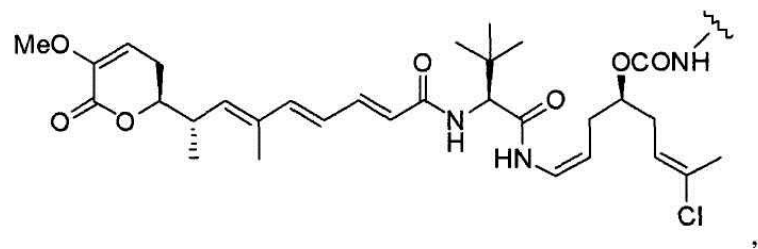
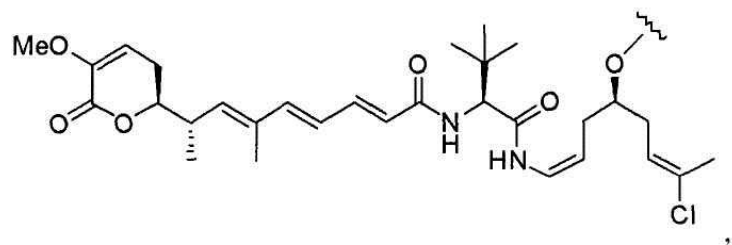
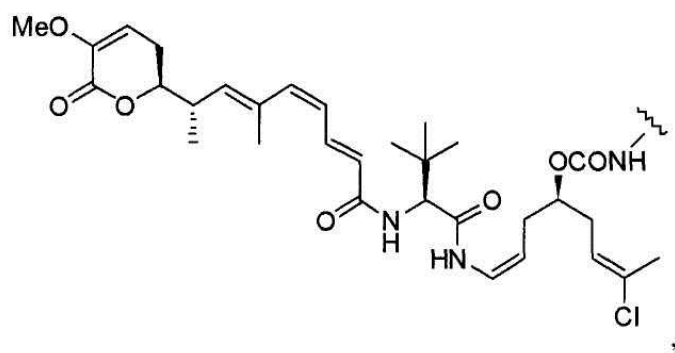
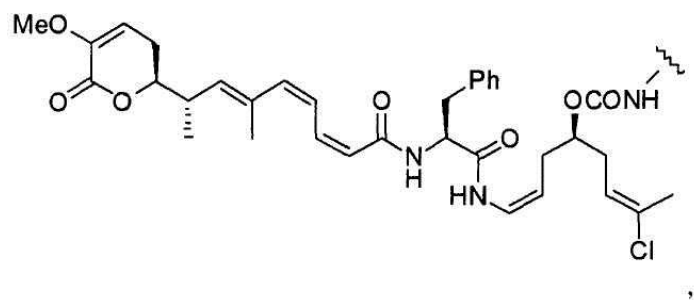
Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, $(AA)_w$ і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:

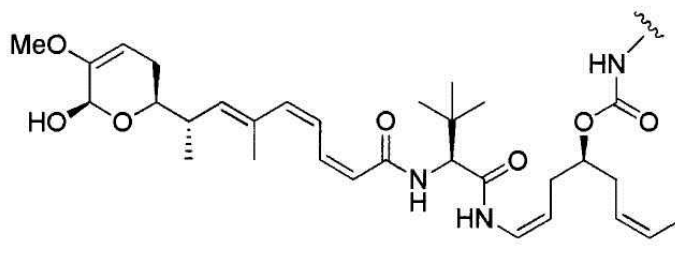
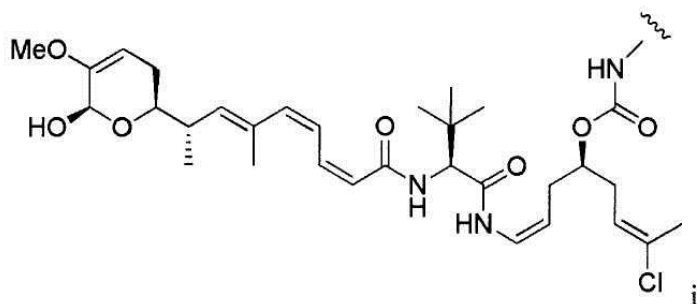
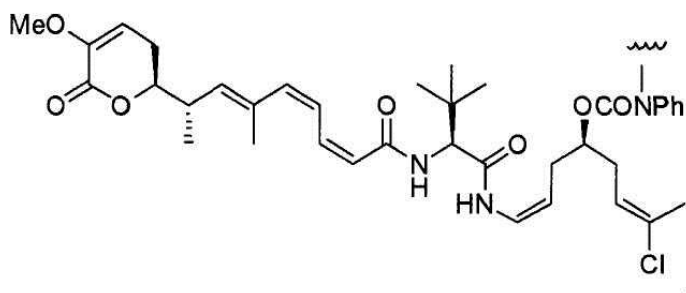






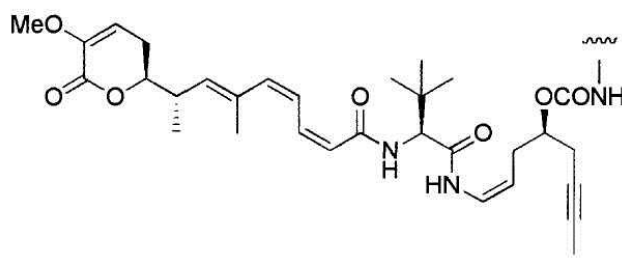
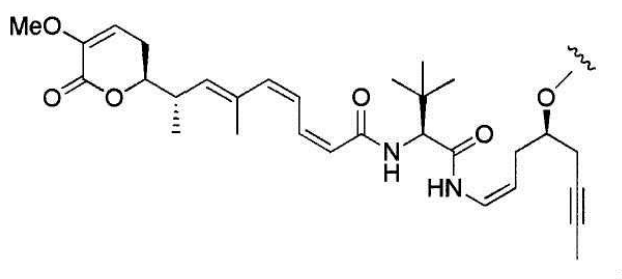






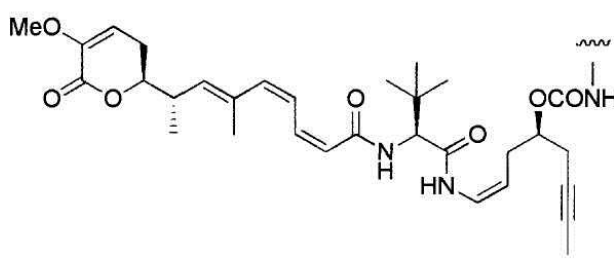
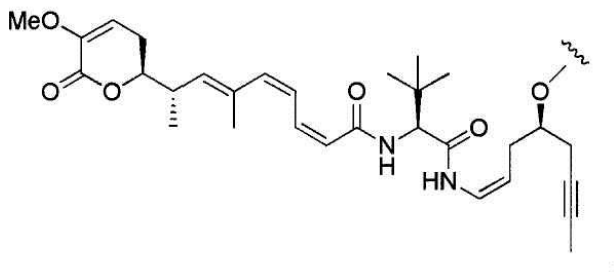
де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до (X)_b, якщо це має місце, або (AA)_w, якщо це має місце, або до лінкерної групи L.

- 5 Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до (X)_b, якщо це має місце, або (AA)_w, якщо це має місце, або до лінкерної групи L.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w і X мають значення, визначені вище, і де D являє собою сполуку формули (I), (Ia) або (Ib) або її фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до (X)_b, якщо це має місце, або (AA)_w, якщо це має місце, або до лінкерної групи L.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і де компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт, являє собою антигенз'язувальний пептид.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт, являє собою антитіло, однодоменне антитіло або його антигенз'язувальний фрагмент.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт, являє собою моноклональне, поліклональне антитіло або біспецифічне антитіло, і де антитіло або його антигенз'язувальний фрагмент виділені з будь-яких видів, переважно людини, миші або кролика.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт, являє собою антитіло або його антигенз'язувальний фрагмент, що вибрані із групи, яка включає людське антитіло, антигенз'язувальний фрагмент людського антитіла, гуманізоване антитіло, антигенз'язувальний фрагмент гуманізованого антитіла, химерне антитіло, антигенз'язувальний фрагмент химерного антитіла, глікозиловане антитіло і глікозилований антигенз'язувальний фрагмент.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-A відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт, являє собою антитіло або його антигенз'язувальний фрагмент, де антитіло або його антигенз'язувальний фрагмент являє собою антигенз'язувальний фрагмент, вибраний із групи, що включає Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент і Fv-фрагмент.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, (AA)_w, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигенз'язувальний сайт,

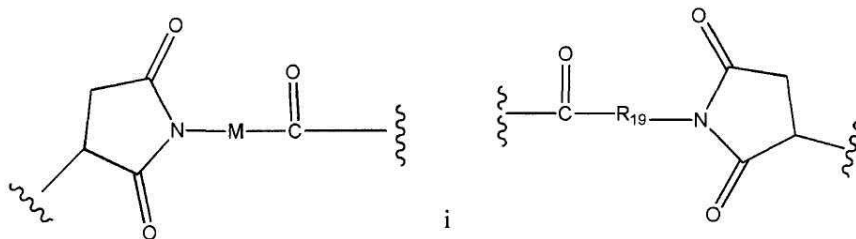
являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент являє собою моноклональне антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракових клітин, вірусними антигенами, антигенами клітин, які продукують аутоімунні антитіла, пов'язані з аутоімунним захворюванням, мікробними антигенами, переважно моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракових клітин.

Ще один переважний кон'югат лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу являє собою кон'югат, де L, $(AA)_w$, X і D мають значення, визначені вище, і компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою антитіло, вибране з групи, що включає Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиликсимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Глембатумумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Інотузумаб, Лабетузумаб, Лорвотізуумаб, Мілатузумаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Пінатумумаб, Ритуксимаб, Ворсетузумаб, Трастузумаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину, де переважне антитіло вибране з Абциксимабу, Алемтузумабу, Базиликсимабу, Бевацизумабу, Цетуксимабу, Даклізумабу, Глембатумумабу, Гемтузумабу, Ібритутомабу, Інотузумабу, Лабетузумабу, Лорвотізуумабу, Мілатузумабу, Німотузумабу, Омалізумабу, Палівізумабу, Панітумумабу, Пінатумумабу, Ритуксимабу, Ворсетузумабу, Трастузумабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, ще більш переважним є Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиликсимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Ритуксимаб і Трастузумаб або його імунологічно активна частина. З перерахованого вище, особливо переважними є Трастузумаб, Ритуксимаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активна частина; або антитіло вибране з Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, особливо Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або антитіло вибране з анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, особливо анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини.

Особливо переважні кон'югати лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ відповідно до першого аспекту даного винаходу включають наступні:

(а) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу, де:

L вибраний із групи, що включає:



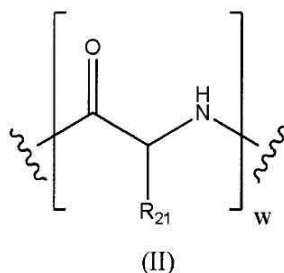
де:

хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до Ab (хвиляста лінія праворуч) і $(AA)_w$, якщо це має місце, або $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч);

R_{19} вибраний з $-C_1-C_{12}$ -алкілену-, $-O-(C_1-C_{12}$ -алкілену), $-C_6-C_{12}$ -арилілену в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}$ -алкілен- C_6-C_{12} -арилілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_6-C_{12}$ -арилілен- C_1-C_{12} -алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_5-C_{12}$ -гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}$ -алкілен- $(C_5-C_{12}$ -гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(C_5-C_{12}$ -гетероцикло)- C_1-C_{12} -алкілену-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково

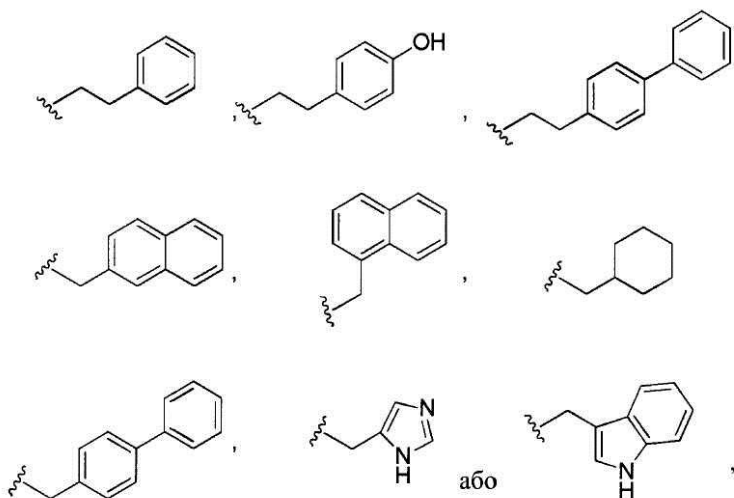
заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(OCH_2CH_2)_r-$ і $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r-$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

- 5 М вибраний із групи, що включає $-C_1-C_6$ -алкілен-, $-C_1-C_6$ -алкілен- $(C_3-C_8$ -карбоцикло)- і фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ;
 r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 6;
 (AA)_w являє собою формулу (II):



- 10 де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або до групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

- R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, ізобутіл, втор-бутил, бензил, пара-гідроксибензил, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$,
 15 $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил,



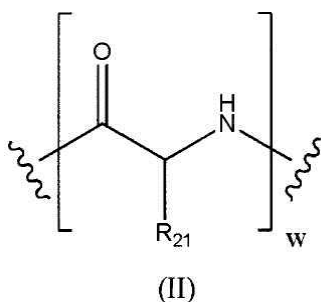
w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

- 20 де X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-CONH-(C_1-C_6$ -алкілен) $NH-$, $-COO-CH_2-$ (фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)- $NH-$, $-CONH-(C_1-C_6$ -алкілен) $NH-COO-CH_2-$ (фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)- $NH-$, $-CH_2-$ (фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)- $NH-$, $-COCH_2NH-COCH_2NH-$, $-COCH_2NH-$, $-CONH-(C_1-C_6$ -алкілен) $S-$,
 25 $-CONH-(C_1-C_6$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_6$ -алкілен) $S-$, $-(C_1-C_6$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_6$ -алкілен) $S-$, $-(C_1-C_6$ -алкілен) $S-$, $-(C_1-C_6$ -алкілен) $NH-$ і $-(C_1-C_6$ -алкілен) $NH-COO-CH_2-$ (фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)- $NH-$;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

- 30 R_1 вибраний з водню, OR_a і $OCOR_a$, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_2 і R_3 , кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C_1-C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;



де:

хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

5 R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, втор-бутил, бензил, індолілметил, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ і $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$;

w являє собою ціле число від 0 до 6;

10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$, $-COO-CH_2\text{-фенілен}-NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-фенілен}$, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, $-COCH_2NH-COCH_2NH-$, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$ і $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-фенілен}$, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 являє собою водень або метокси;

кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;

R_3' являє собою водень;

кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню, заміщеного і незаміщеного метилу, заміщеного і незаміщеного ізопропілу і заміщеного і незаміщеного трет-бутилу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає:

водень і заміщені або незаміщені C_1-C_6 -алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z , NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

R_{18} вибраний з водню, C_1-C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x , і фенільної групи, що необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x ;

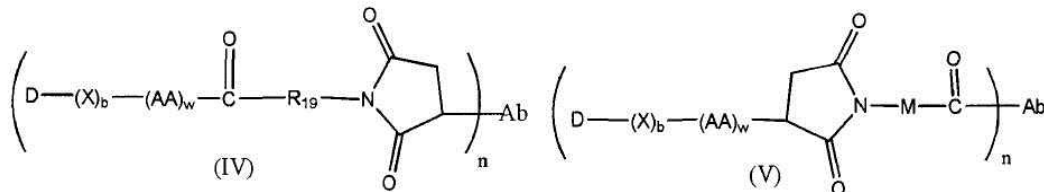
R_{27} являє собою атом водню або атом хлору;

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R_{25} , і атомом C, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де антитіло або антигензв'язувальний фрагмент являє собою моноклональне антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракових клітин, вірусними антигенами, антигенами клітин, що продукують аутоімунні антитіла, пов'язані з аутоімунним захворюванням, мікробними антигенами, переважно моноклональне антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракових клітин; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 8;

(с) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту, вибраний з формул (IV) і (V):



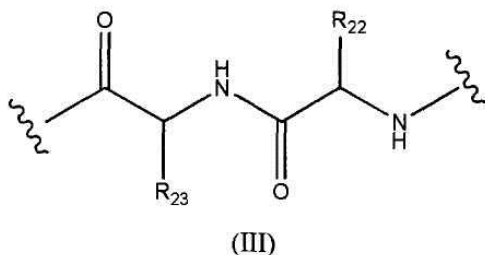
5

де:

R_{19} вибраний з - C_1 - C_6 -алкілену-, -фенілен- C_1 - C_6 -алкілену-, де феніленова група може бути необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, окремо або приєднаний до іншої групи у вуглецевому ланцюзі, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, арильні групи, які містять від 6 до 12 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, переважно R_{19} являє собою C_1 - C_6 -алкіленову групу;

M являє собою - C_1 - C_3 -алкілен-(C_5 - C_7 -карбоцикло)-;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



(III)

де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

R_{22} вибраний з метилу, бензилу, ізопропілу, втор-бутилу і індолілметилу;

R_{23} вибраний з метилу, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$ і $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH-, $-COO-CH_2$ -фенілен-NH-, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $-COO-CH_2$ -(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, $-COCH_2NH-COCH_2-NH-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- і $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $-COO-CH_2$ -(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 являє собою водень або метокси;

кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;

R_3' являє собою водень;

кожний з R_5 , R_7 , R_8 , R_9 і R_{10} являє собою водень;

кожний з R_4 і R_6 являє собою метил;

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

R_{12} являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що складається з водню і C_1 - C_6 -алкільної групи, переважно з водню і метилу;

R_{18} вибраний з водню і фенілу, переважно з водню;

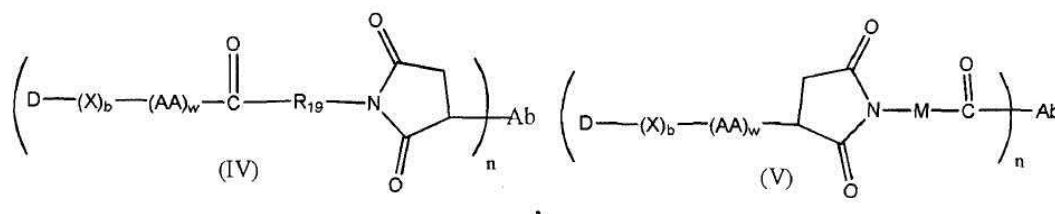
R_{27} являє собою атом водню або атом хлору;

5 кожна пара атомів вуглецю, з'єднана однією або декількома пунктирними лініями, зв'язана через подвійні зв'язки;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою моноклональне антитіло, вибране з групи, що включає Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиліксимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Глембатумумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Інотузумаб, Лабетузумаб, Лорвотіузумаб, Мілатузумаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Пінатумумаб, Ритуксимаб, Ворсетузумаб, Трастузумаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину, переважно моноклональне антитіло вибране з групи, що включає Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиліксимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Глембатумумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Інотузумаб, Лабетузумаб, Лорвотіузумаб, Мілатузумаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Пінатумумаб, Ритуксимаб, Ворсетузумаб, Трастузумаб і анти-CD4 антитіло або його імунологічно активну частину, ще більш переважним є Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиліксимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Ритуксимаб і Трастузумаб або його імунологічно активна частина. З перерахованого вище, особливо переважними є антитіла, вибрані з Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; більш переважне антитіло вибране з Трастузумабу, анти-CD13 антитіла, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла або його імунологічно активної частини; або антитіло вибране з Трастузумабу і Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно з Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або антитіло вибране з анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, особливо з анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5;

(d) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу, вибраний з формул (IV) і (V):

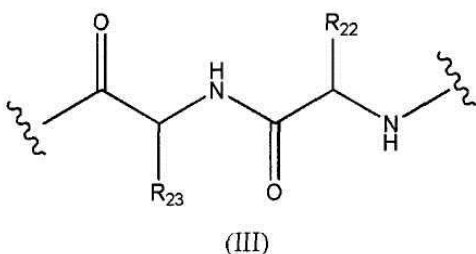


де:

R_{19} являє собою $-C_3$ - C_6 -алкілен-;

M являє собою $-C_1$ - C_3 -алкілен- $(C_5$ - C_7 -карбоцикло)-;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):

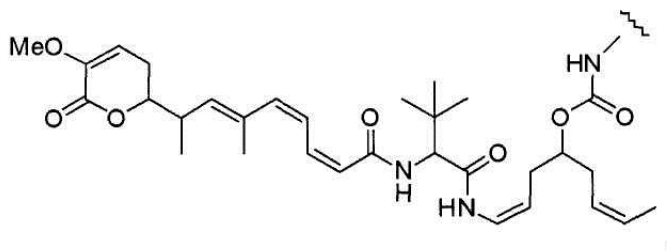
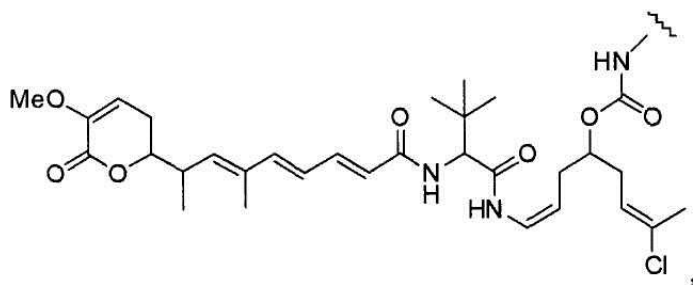
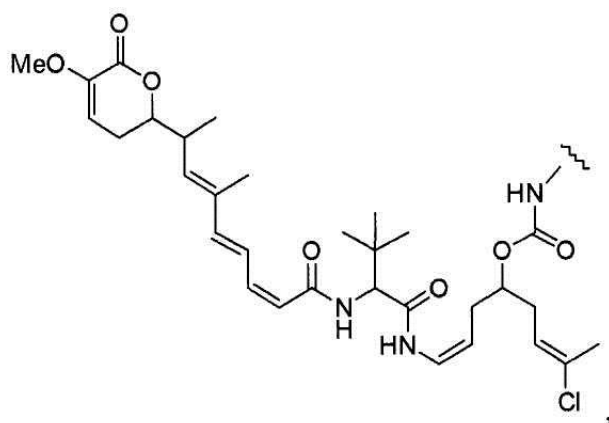
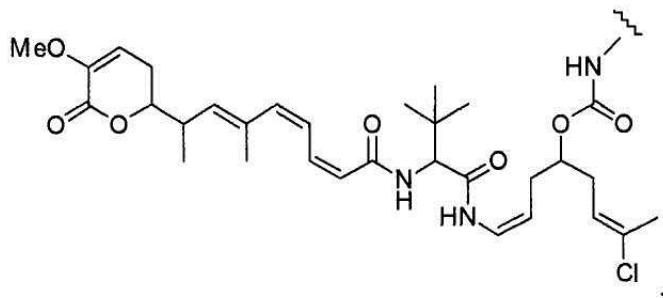


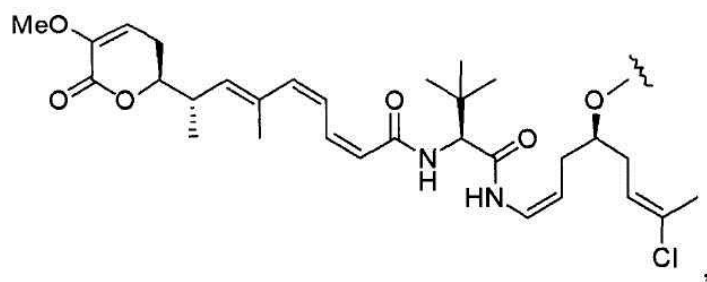
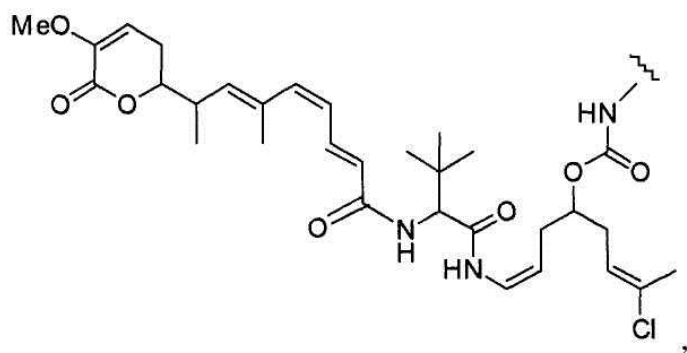
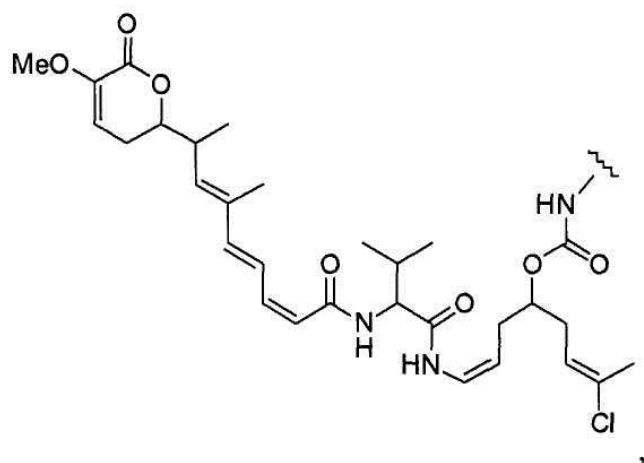
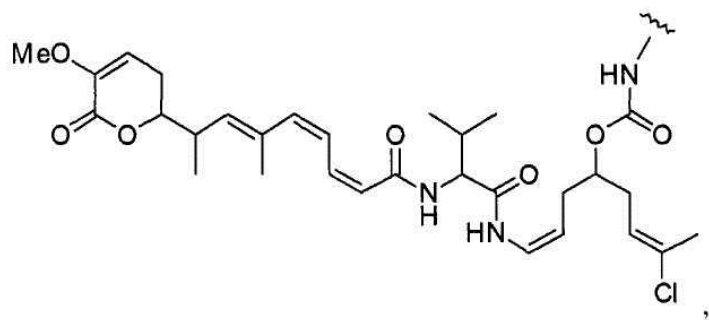
де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

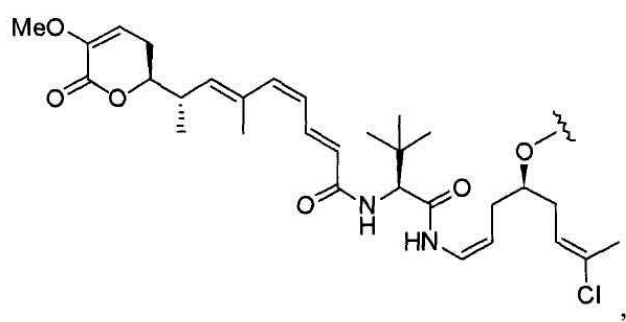
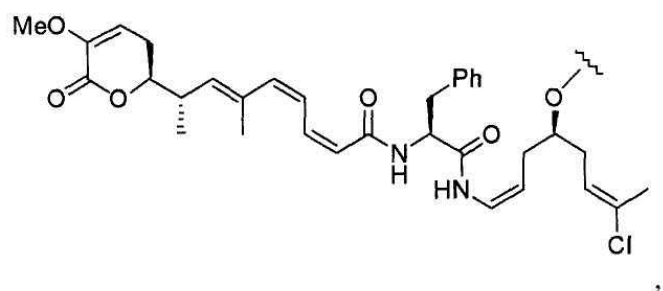
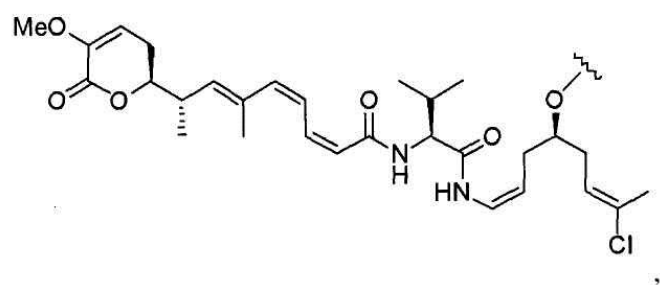
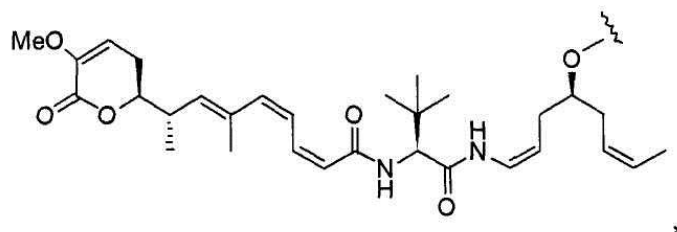
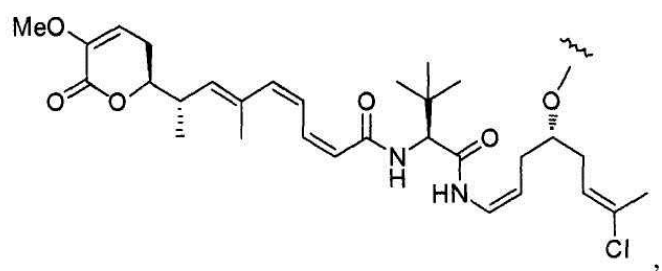
X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2$ - C_4 -алкілен) $NH-$, $-COO-CH_2$ -фенілен- $NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які

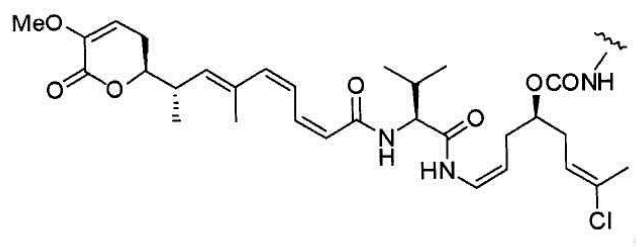
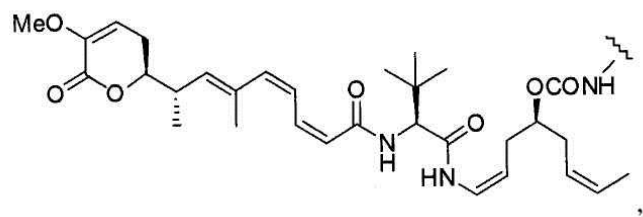
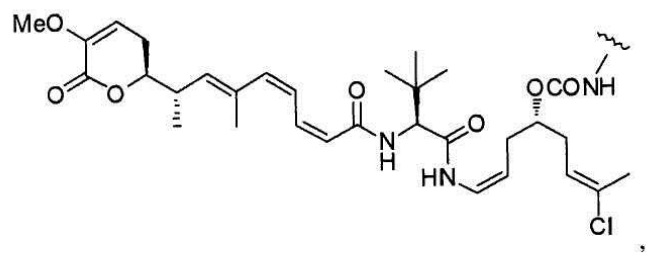
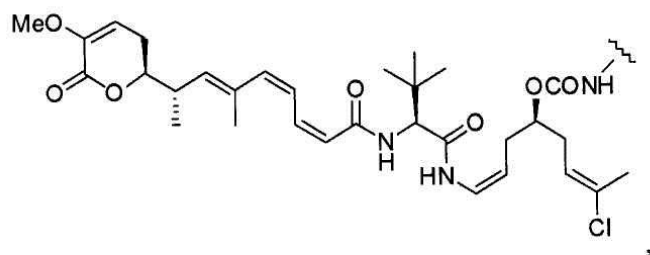
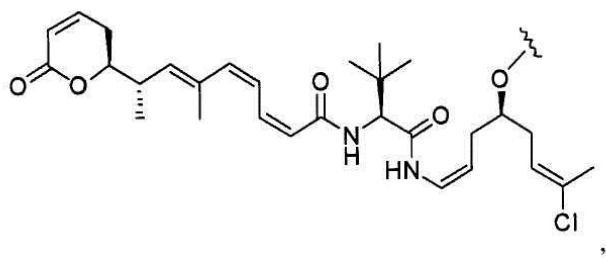
містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$, $-\text{COCH}_2\text{NH}-\text{COCH}_2\text{NH}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-$ і $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$;

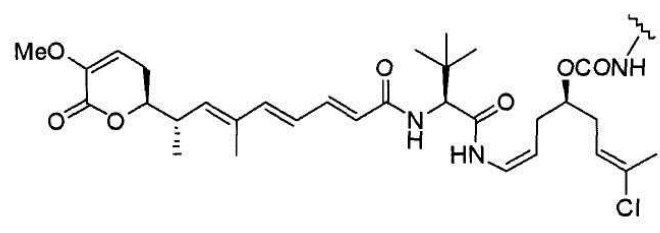
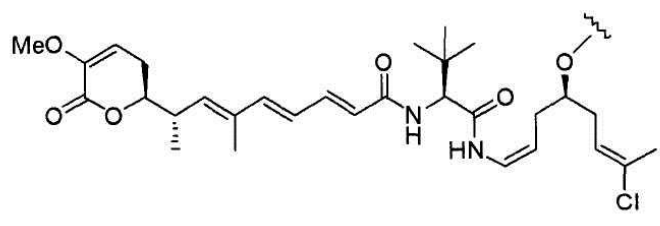
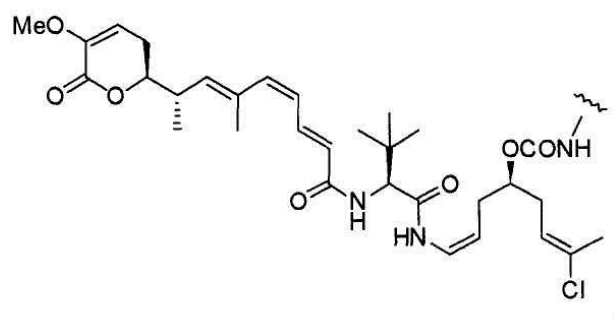
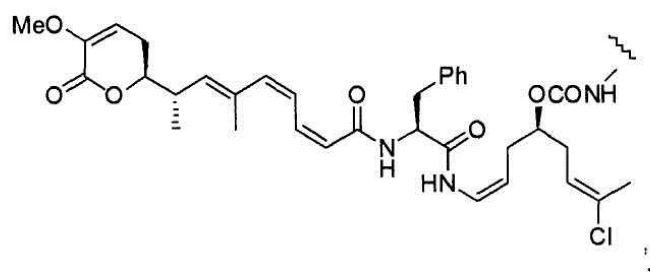
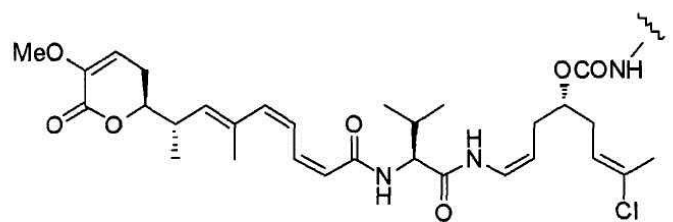
D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з наступної групи:

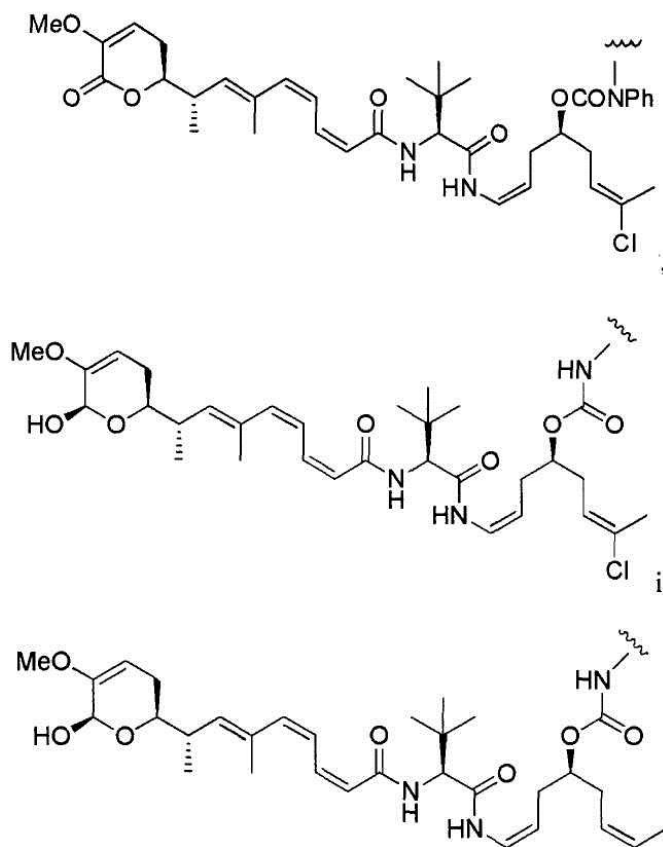










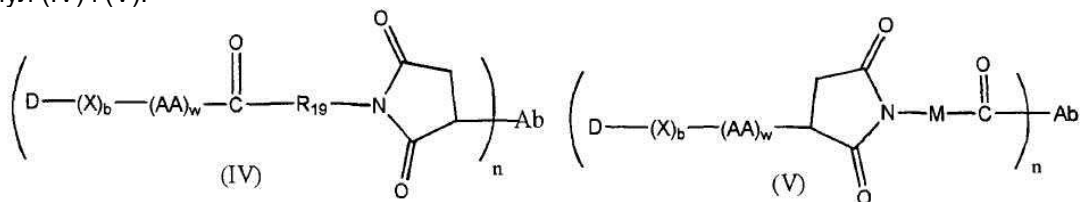


де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

- компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із
- 5 Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, більш переважно він вибраний із Трастузумабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, або він вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або він вибраний з
- 10 анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, особливо анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5;

- 15 (е) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу, вибраний з формул (IV) і (V):

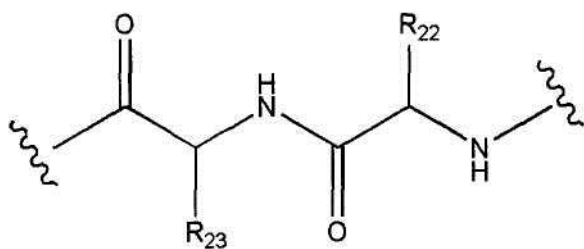


де:

R_{19} являє собою $-C_3-C_6$ -алкілен-;

M являє собою $-C_1-C_3$ -алкілен- $(C_5-C_7$ -карбоцикло)-;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):

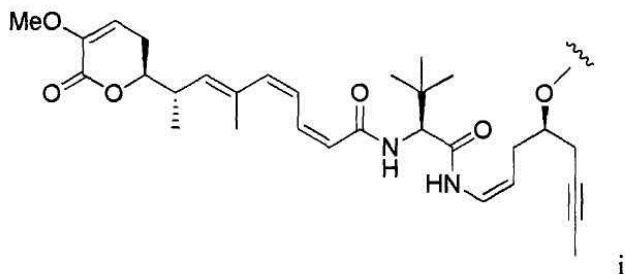


(III)

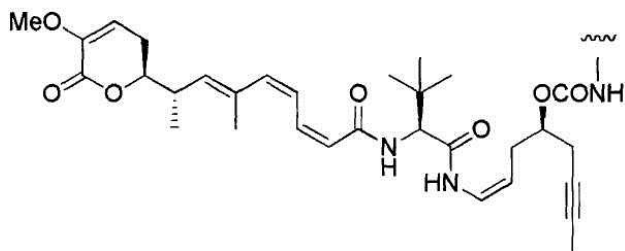
де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

- 5 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$, $-COO-CH_2\text{-фенілен}-NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-(фенілен)}$, що може
- 10 бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, $-COCH_2NH-COCH_2-NH-$, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$ і $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-(фенілен)}$, що
- 15 може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



i



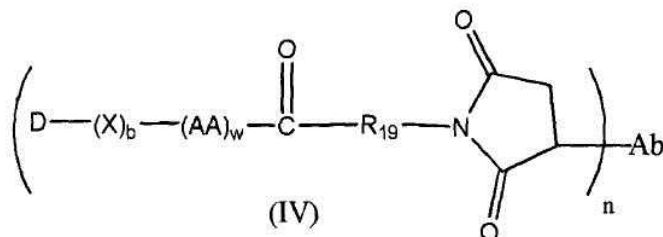
20

де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

- компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або
- 25 його імунологічно активної частини; більш переважно він вибраний з Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини; найбільш переважно він являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5;

(f) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу формули (IV):



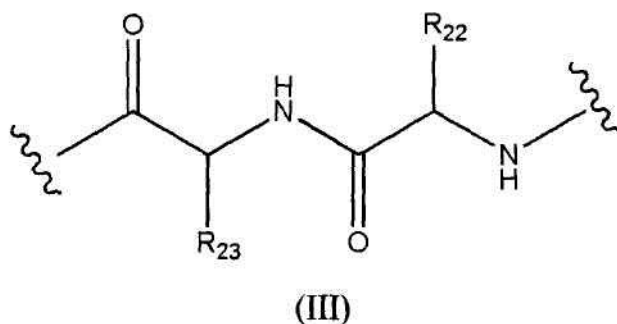
5

де:

R_{19} являє собою $-C_5$ -алкілен-;

b має значення 1;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):

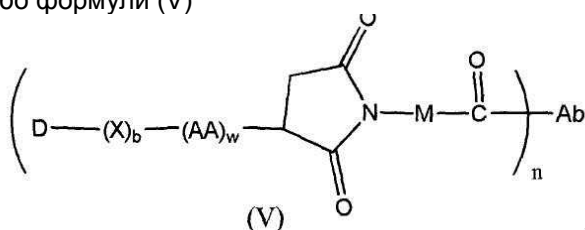


10

де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH- і $-(CH_2)_3NH$ -; або формули (V)

15



де M являє собою -метилциклогексил-;

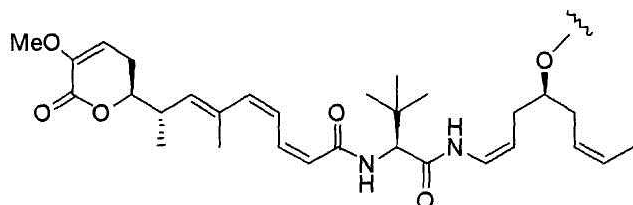
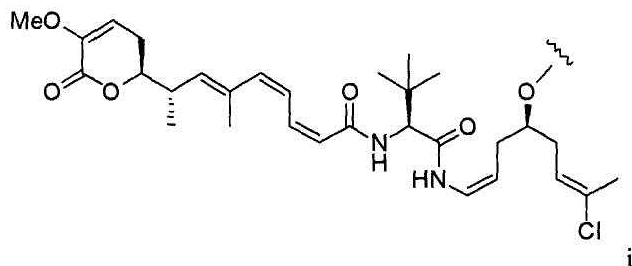
b має значення 1;

w має значення 0; і

20

X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3S$ - і $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$ -;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:

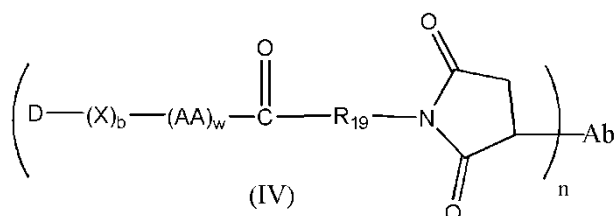


де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

- компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою
- 5 Трастузумаб, Ритуксимаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину; більш переважно він вибраний із Трастузумабу, анти-CD13 антитіла, анти-CD4 антитіла й анти-CD5 антитіла або його імунологічно активної частини; або він вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно він являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; або він вибраний з анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно він являє собою анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину; і

- 10 п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (V) або (VI), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4;

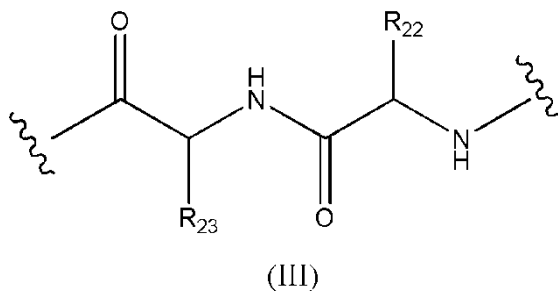
- 15 (g) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу формули (IV):



де R_{19} являє собою $-C_5$ -алкілен-;

- 20 b має значення 1;

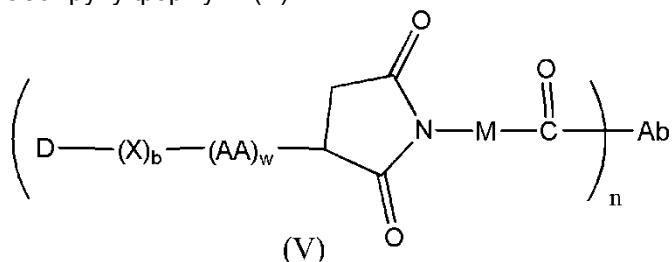
w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

- 25

Х являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH- і $-(CH_2)_3NH$ -;
 ;
 або групу формули (V)



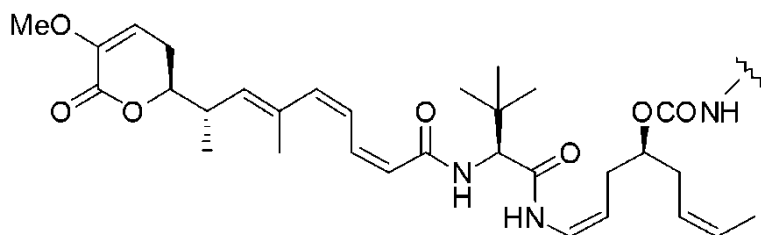
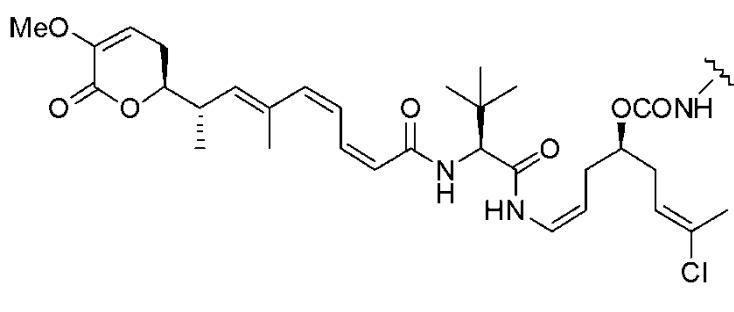
5 де М являє собою -метилциклогексилен-;

б має значення 1;

в має значення 0; і

Х являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3S$ - і $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$ -;

10 Д означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:

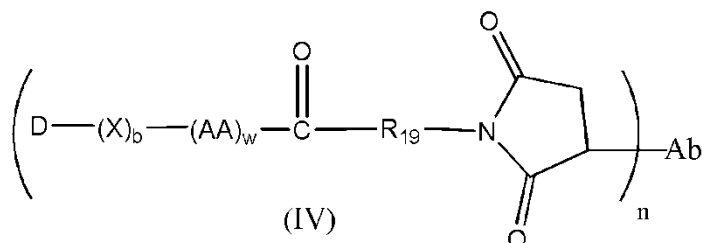


де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

15 компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; більш переважно він вибраний із Трастузумабу, анти-CD13 антитіла, анти-CD4 антитіла й анти-CD5 антитіла або його імунологічно активної частини; або він вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини; найбільш переважно він являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; або він вибраний з анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно він являє собою анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину; і

25 п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (V) або (VI), до фрагмента Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4;

h) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу формули (IV):

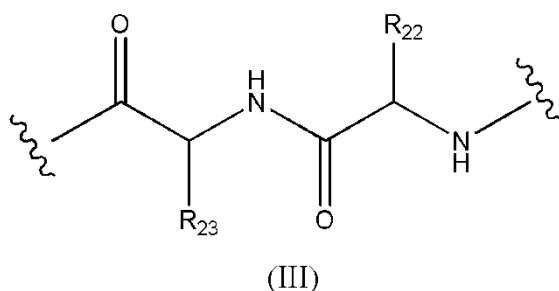


де:

R_{19} являє собою $-C_5$ -алкілен-;

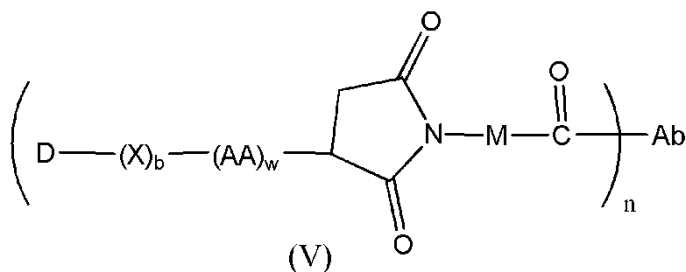
b має значення 1;

5 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH- і $-(CH_2)_3NH$; або групу формули (V)



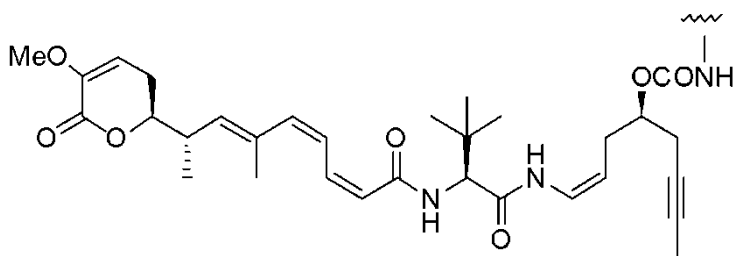
де M являє собою -метилциклогексилен-;

b має значення 1;

15 w має значення 0; і

X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3S$ - і $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули



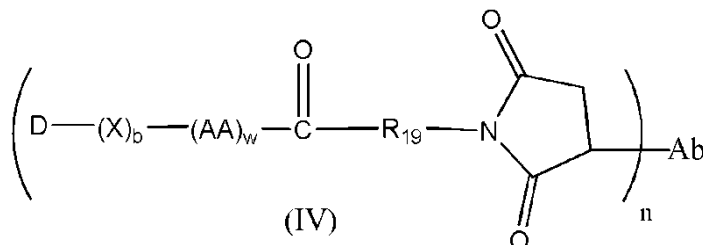
20 або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L ;

компонент Ab , що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, або він вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4

антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно він являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (V) або (VI), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4;

і) кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу формули (IV):

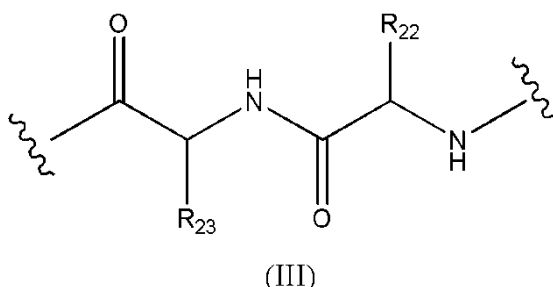


де:

R₁₉ являє собою -C₅-алкілен-:

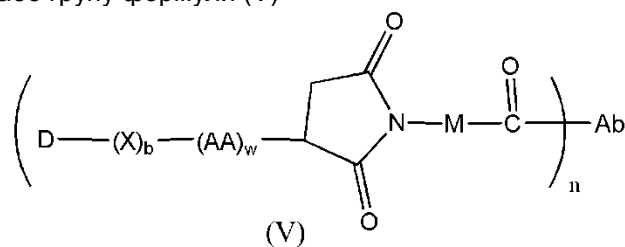
в має значення 1:

в має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



де R₂₂ являє собою ізопропіл, R₂₃ являє собою -(CH₂)₃NHCONH₂, і хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

Х являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3NHC(=O)OCH_2$ -фенілен-NH- і $-(CH_2)_3NH$ -; або групу формули (V)



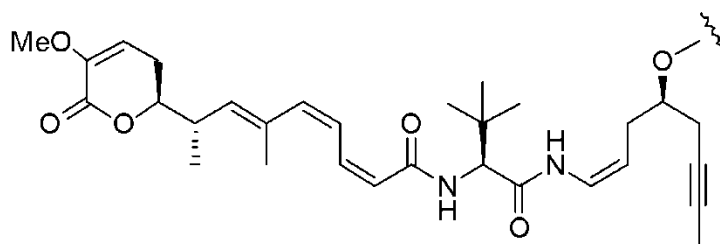
де М являє собою -метилциклогексилен-;

в має значення 1;

в має значення 0; і

Х являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3S-$ і $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S-$;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули



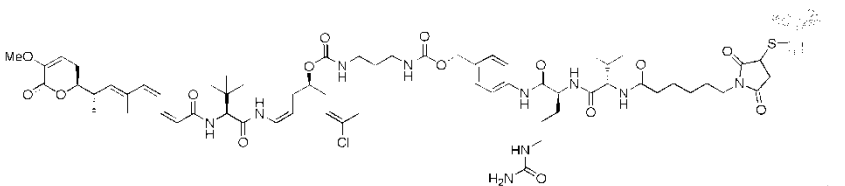
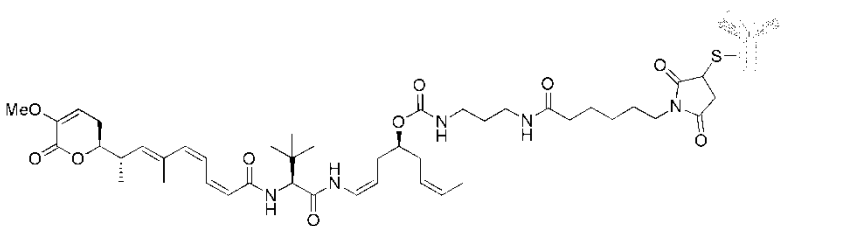
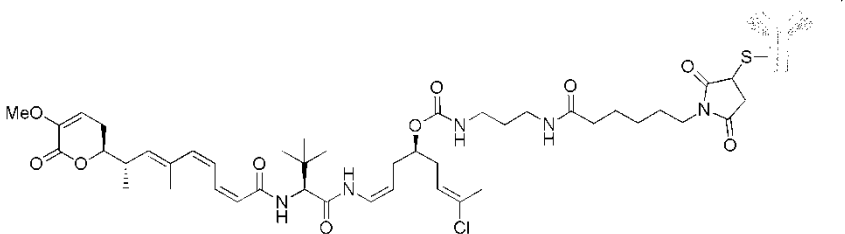
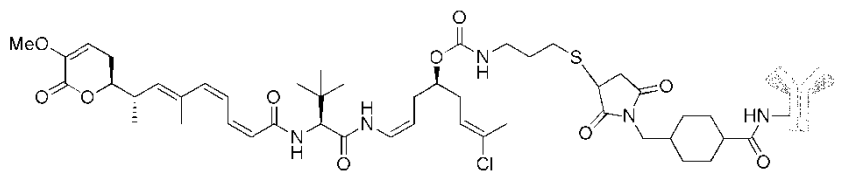
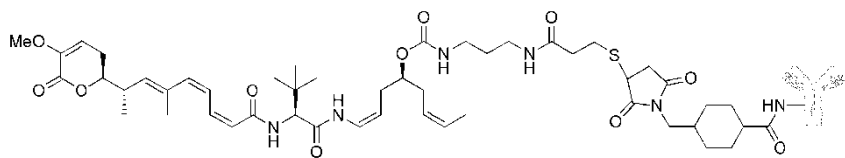
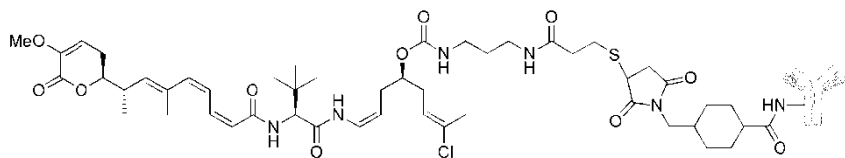
або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер,

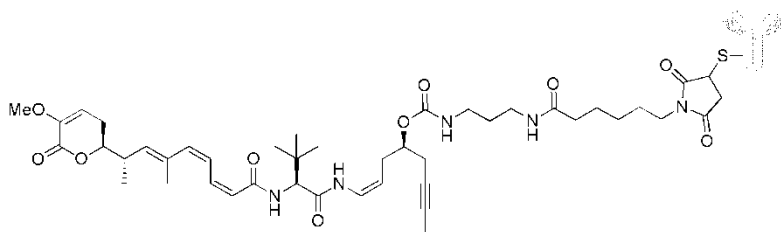
де хвилясті лінії вказують точку ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, або він вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно він являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; і

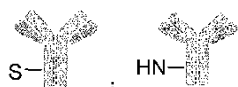
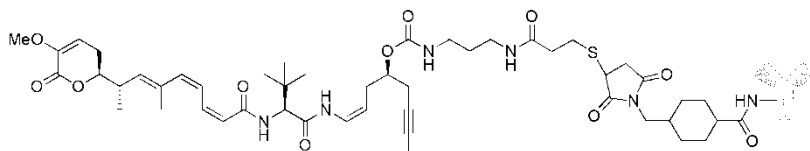
п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4;


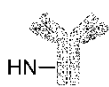
(j) кон'югат антитіла з лікарським засобом відповідно до першого аспекту даного винаходу, вибраний із групи, що включає:

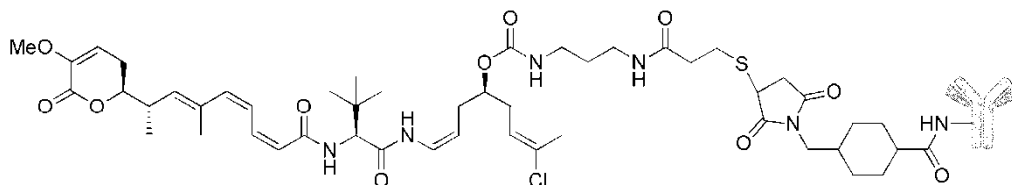





и

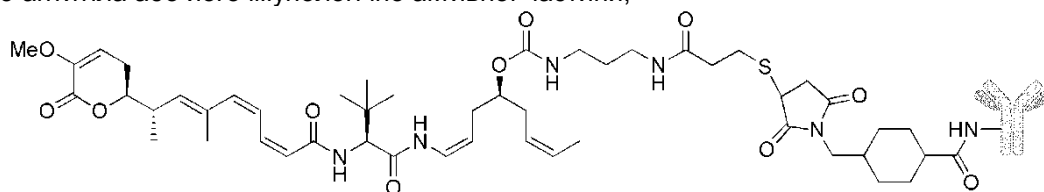



- де кожний з  і  вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або, альтернативно, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини. Більш переважно кон'югат антитіла з лікарським засобом вибраний із групи, що включає:

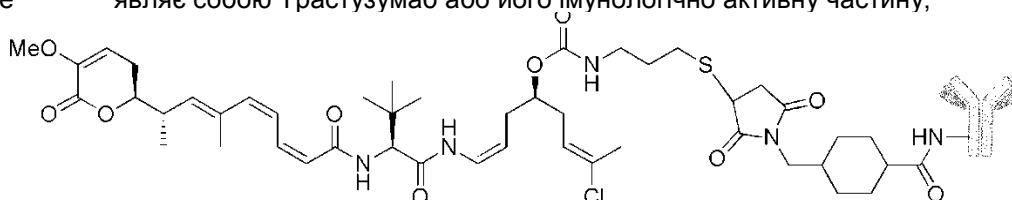


10


- де  вибраний із Трастузумабу й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або переважно анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини,

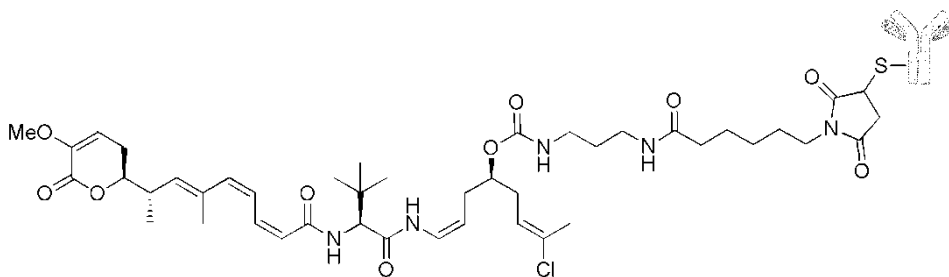



- де  являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину,

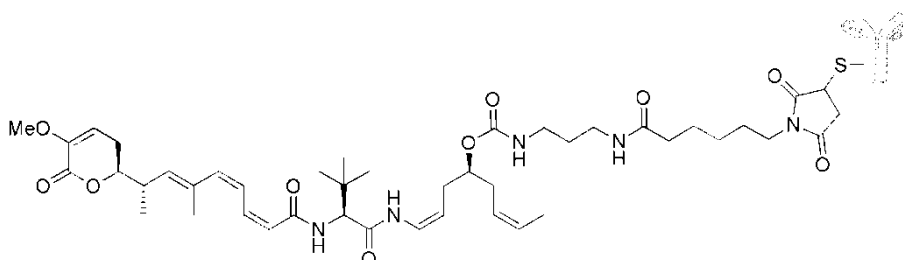



15

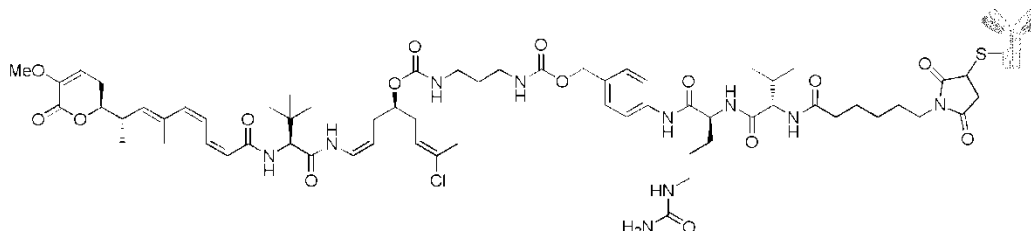
- де  являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину,




- де  вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або, альтернативно, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини,

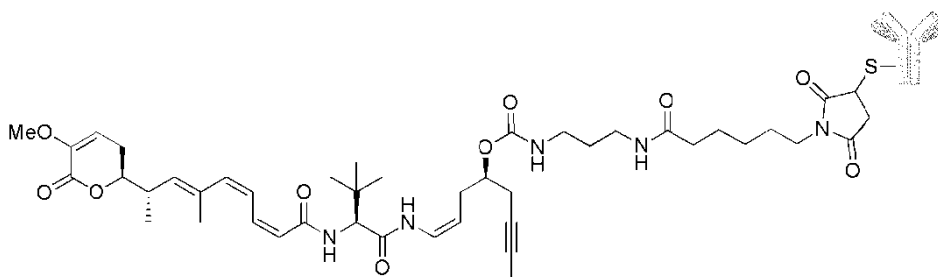


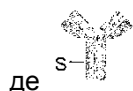
- де  являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину,



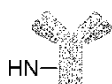
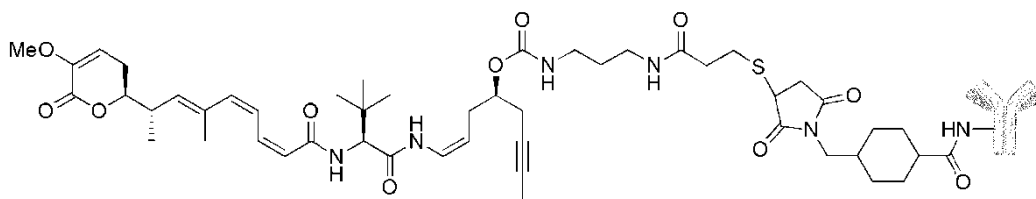
10

- де  вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, переважно Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно Трастузумабу або його імунологічно активної частини; або, альтернативно, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини,





де являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину, і



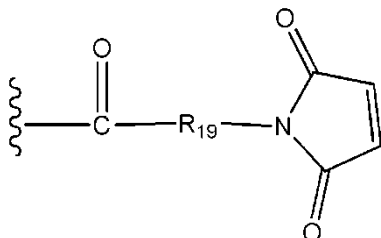
де являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.

Особливо переважно, кон'югати антитіла з лікарським засобом відповідно до даного винаходу повинні бути у виділеній або очищеній формі.

Переважні сполуки формули D-X-(AA)_w-(L₁)_b згідно з другим аспектом даного винаходу включають:

сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H згідно з другим аспектом даного винаходу, де:

L₁ являє собою лінкер формули:



де:

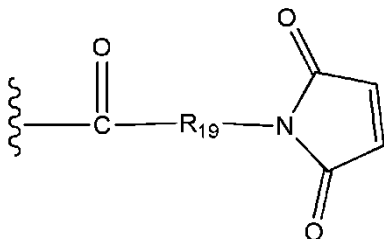
хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до X;

R₁₉ вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -O-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₂-арилу в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-C₆-C₁₂-арилу-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₂-арилу-C₁-C₁₂-алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₅-C₁₂-гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту і/або сірки у зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₅-C₁₂-гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може бути насиченою або ненасиченою групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -(OCH₂CH₂)_r- і -CH₂-(OCH₂CH₂)_r-, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x;

r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 6; і

кожний з D, X, AA і w мають значення, визначені в першому аспекті даного винаходу; сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H згідно з другим аспектом даного винаходу, де:

L₁ являє собою лінкер формули:



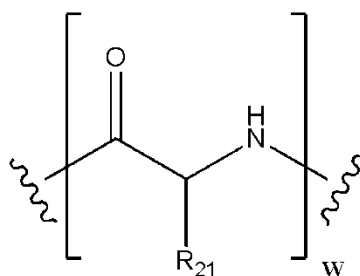
де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;

- 5 R_{19} вибраний з $-C_1-C_8$ -алкілену-, $-O-(C_1-C_8$ -алкілену), $-C_1-C_8$ -алкілен- C_6-C_{12} -арилінену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_6-C_{12}$ -арілен- C_1-C_8 -алкілену-, де ариленова група присутня в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково

10 заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

$(AA)_w$ являє собою формулу (II):



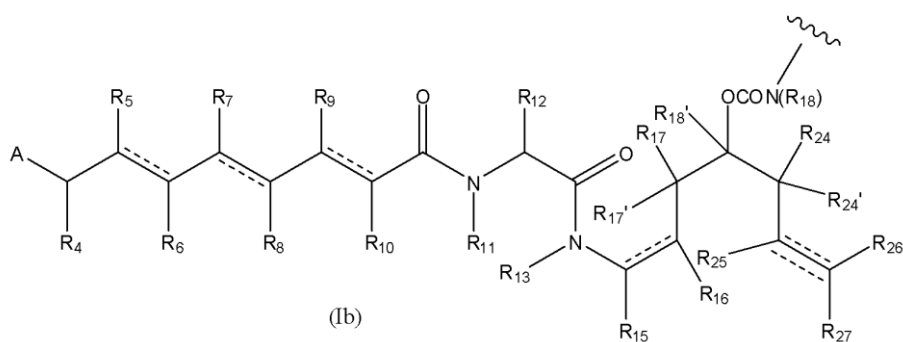
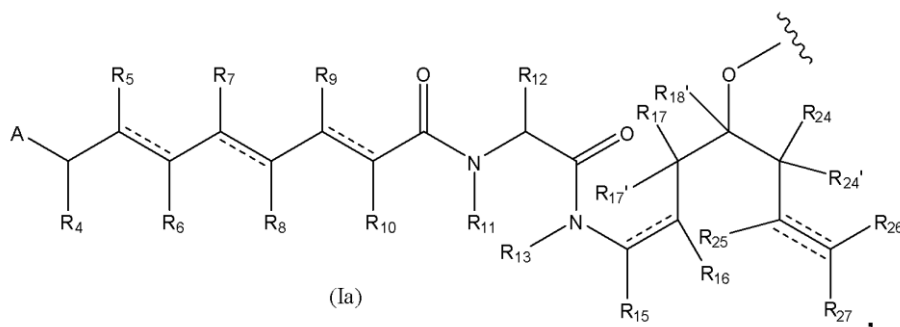
(II)

де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

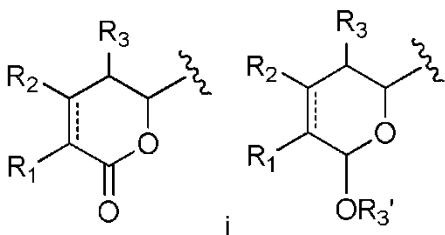
- 15 де R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, втор-бутил, бензил, індолілметил, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ і $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, і w являє собою ціле число від 0 до 6;

- X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH-, $-COO-CH_2$ -фенілен-NH, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $COO-CH_2$ -(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, $-COCH_2NH-COCH_2-NH$ -, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)-NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- і $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $COO-CH_2$ -(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-; і

- 30 D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:



де хвилясті лінії формул (Ia) і (Ib) вказують точку ковалентного приєднання до X;
А вибраний з



де хвилясті лінії групи А вказують точку ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

R_1 вибраний з водню, OR_a і $OCOR_a$, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_2 і R_3 , кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_3' вибраний з водню, COR_a і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де R_a являє собою заміщений або незаміщений C_1 - C_6 -алкіл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} і R_{12} незалежно вибраний з водню і заміщеного і незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{11} і R_{13} незалежно вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{17}' , R_{18}' , R_{24} , R_{24}' , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає:

водень і заміщені або незаміщені C_1 - C_6 -алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z , NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

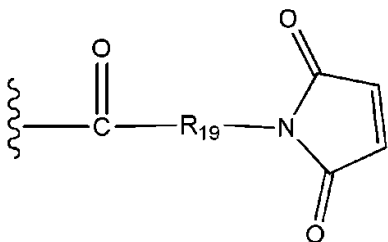
R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що може бути необов'язково заміщена щонайменше однією групою R_x , і фенільної групи, що необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x ;

R_{27} вибраний з водню, галогену і заміщеного або незаміщеного C_1 - C_6 -алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом С, до якого приєднаний R_{25} , і атомом С, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні;

сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H згідно з другим аспектом даного винаходу, де:

L₁ являє собою групу формули:



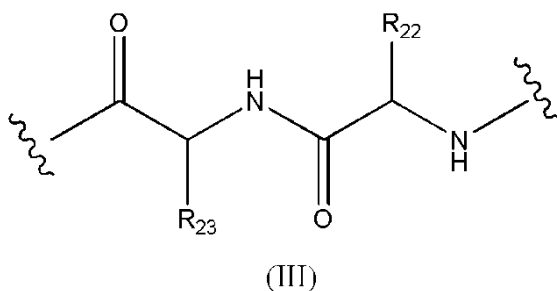
5

де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до X;

R₁₉ вибраний з -C₁-C₆-алкілену-, фенілен-C₁-C₆-алкілену-, де феніленова група може бути необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, окремо або приєднаний до іншої групи у вуглецевому ланцюзі, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, арильні групи, які містять від 6 до 12 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, переважно R₁₉ являє собою C₁-C₆-алкіленову групу;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді (AA)_w являє собою формулу (III):



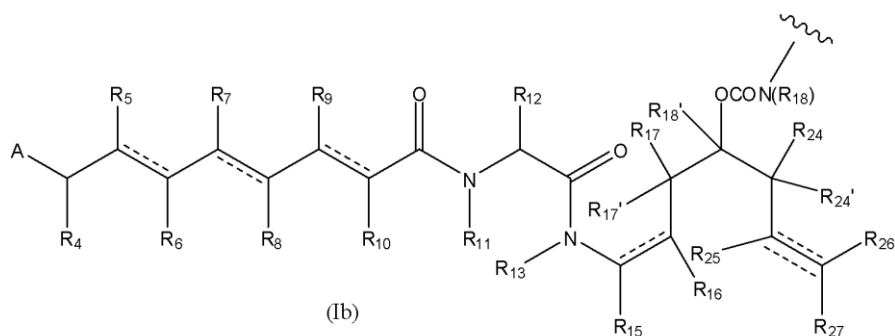
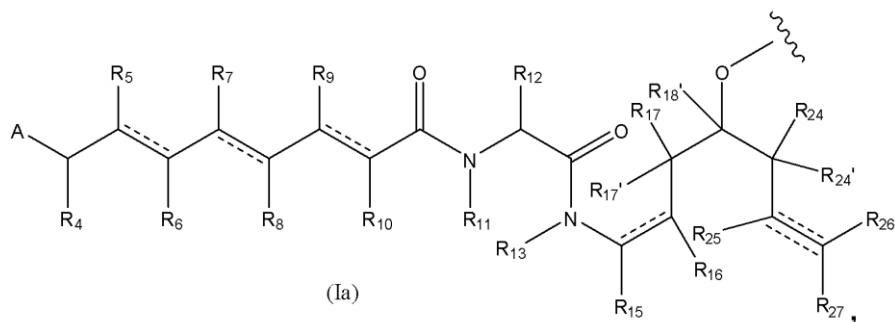
де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L₁ або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

R₂₂ вибраний з метилу, бензилу, ізопропілу, втор-бутилу і індолілметилу;

R₂₃ вибраний з метилу, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₃NHCONH₂ і -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂;

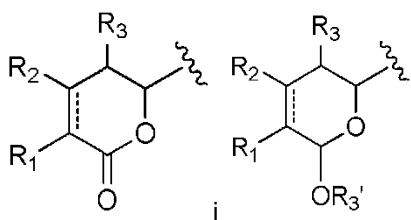
X являє собою розширювальну групу, вибрану з -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-, -CONH(C₂-C₄-алкілен)NHCOO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)S-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NHCO-(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NH- і -(C₂-C₄-алкілен)NHCOO-CH₂-(фенілен, який може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-; і

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:



де хвилясті лінії формули (Ia) або формули (Ib) вказують точку ковалентного приєднання до X;

A вибраний з



5

де хвилясті лінії групи A вказують точку ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

R₁ являє собою водень або метокси;

кожний з R₂ і R₃ являє собою водень;

10 R_{3'} являє собою водень;

кожний з R₅, R₇, R₈, R₉ і R₁₀ являє собою водень;

кожний з R₄ і R₆ являє собою метил;

R₁₂ являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил;

кожний з R₁₁ і R₁₃ являє собою водень;

15 кожний з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R_{17'}, R_{18'}, R₂₄, R_{24'}, R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що складається з водню і C₁-C₆-алкільної групи, переважно водню і метилу;

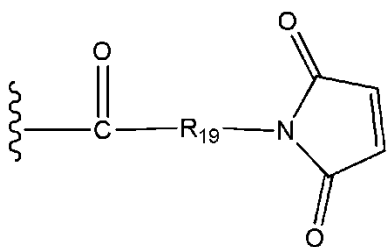
R₁₈ вибраний з водню і фенілу, переважно водню;

R₂₇ являє собою водень або галоген;

20 і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R₂₅, і атомом C, до якого приєднані R₂₆ і R₂₇, тоді R₂₅ і або R₂₆, або R₂₇ відсутні;

сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H згідно з другим аспектом даного винаходу, де:

L₁ являє собою лінкер формули:

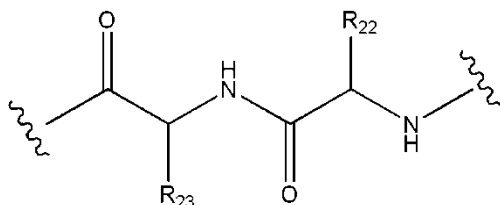


де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;

R_{19} являє собою $-C_3-C_6$ -алкілен-;

5 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



(III)

R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

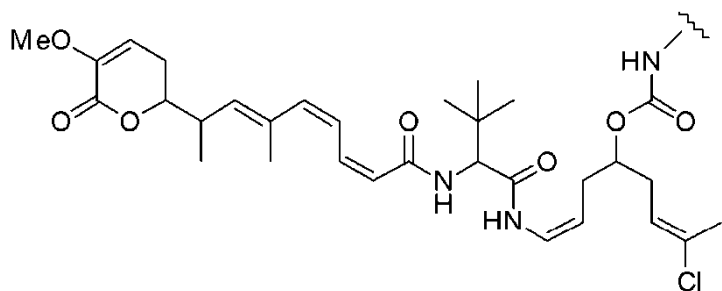
10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-$, $-COO-CH_2$ -фенілен- $NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-COO-CH_2$ -(фенілен, що може

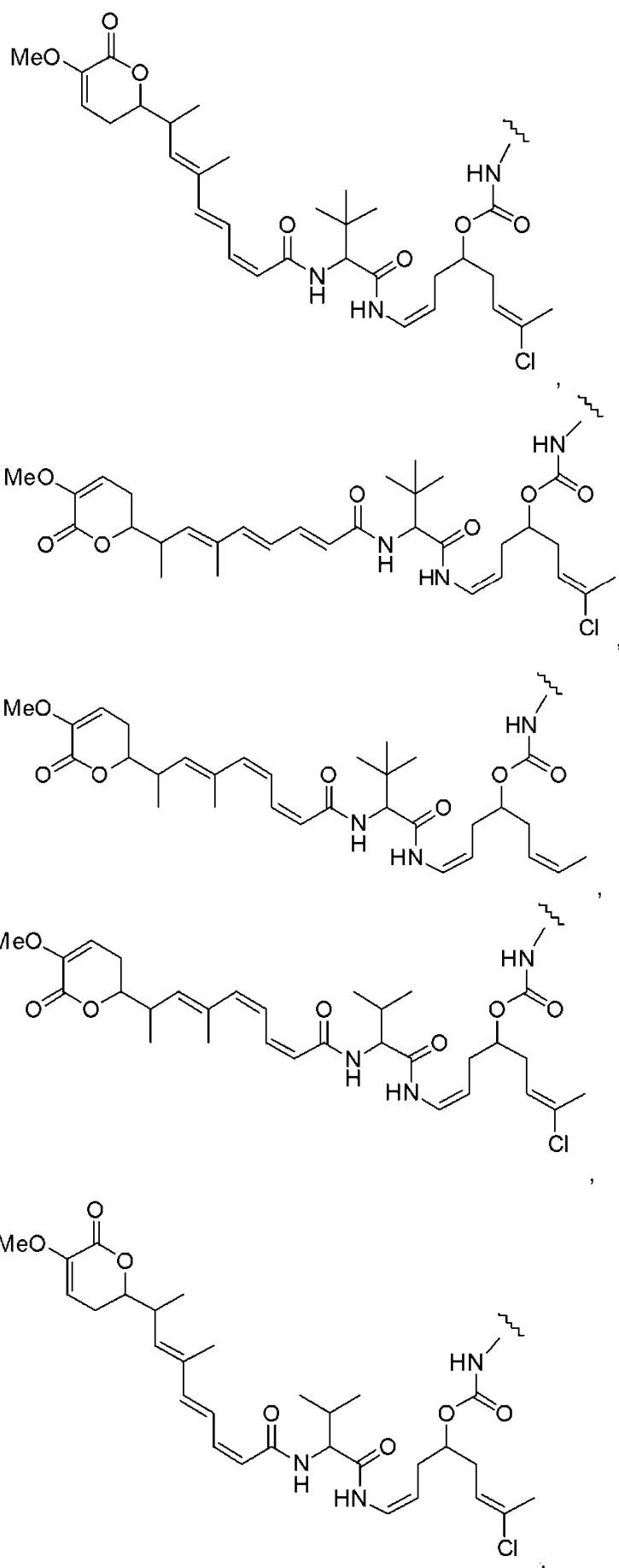
15 бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $NH-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $S-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_3$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_3$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-$ і $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-COO-CH_2$ -(фенілен, що може бути необов'язково

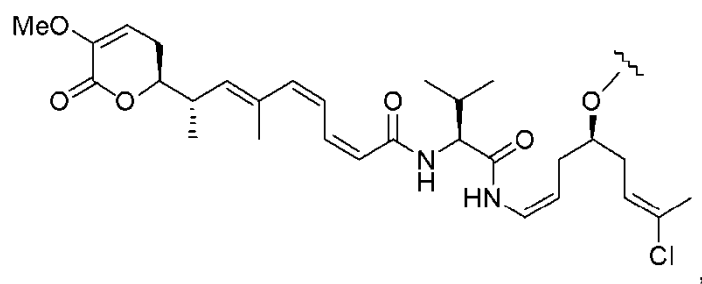
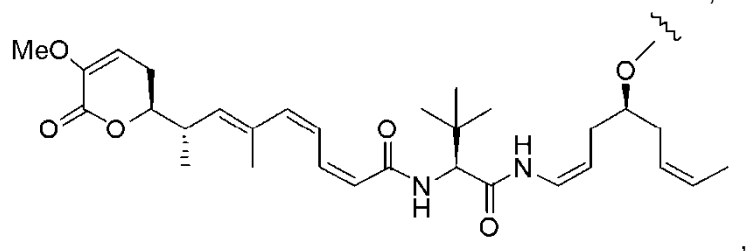
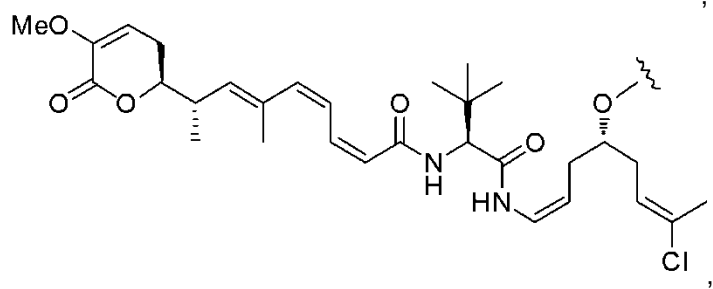
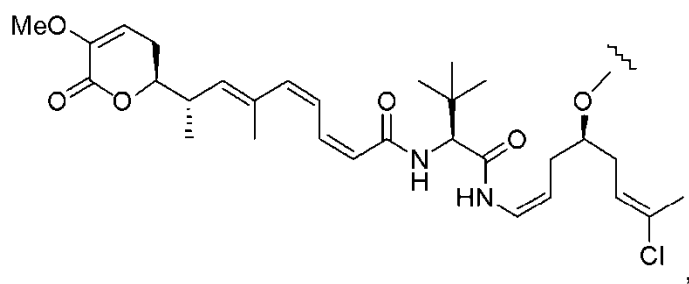
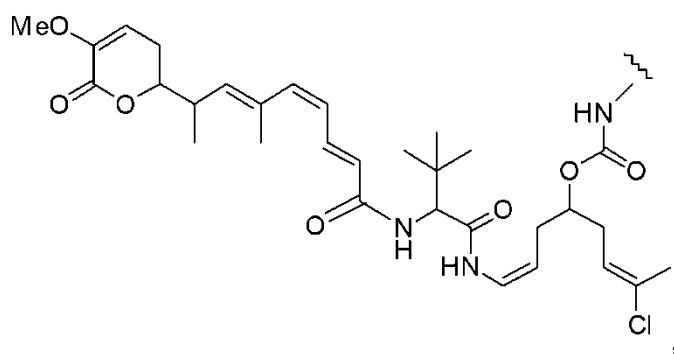
20 заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $NH-$; і

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з

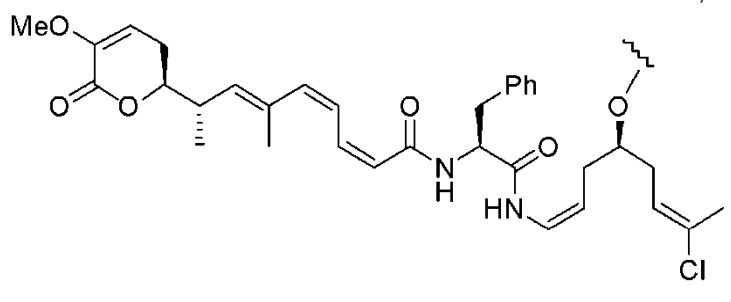
25 наступної групи:

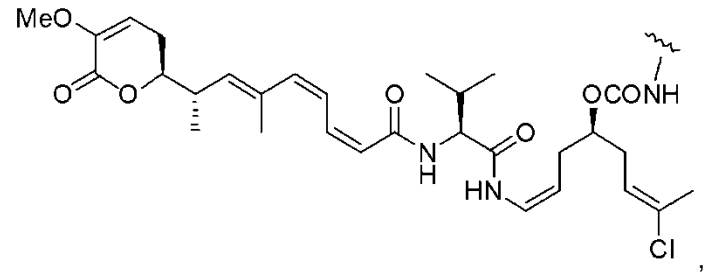
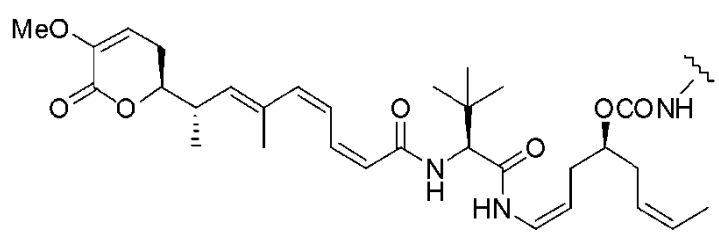
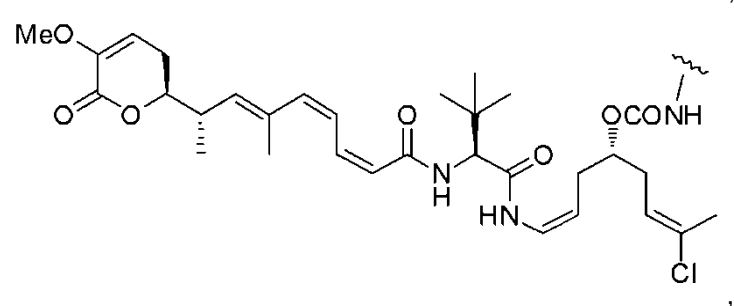
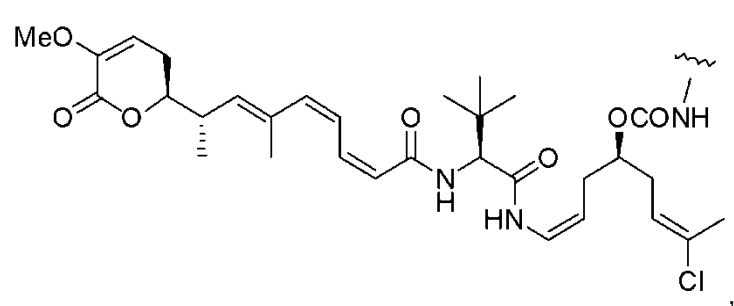
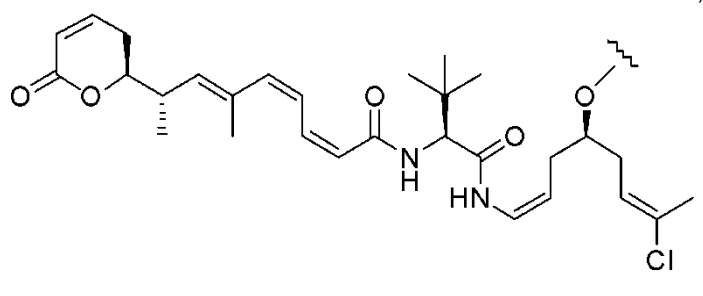
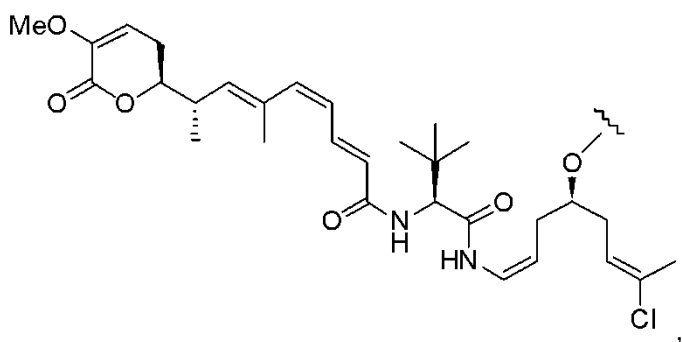




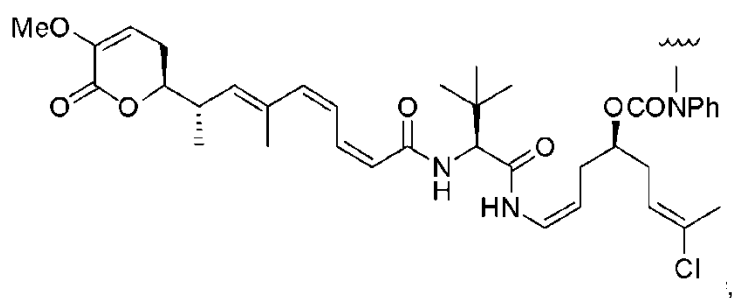
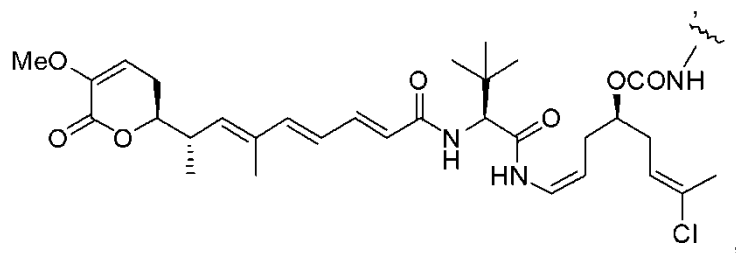
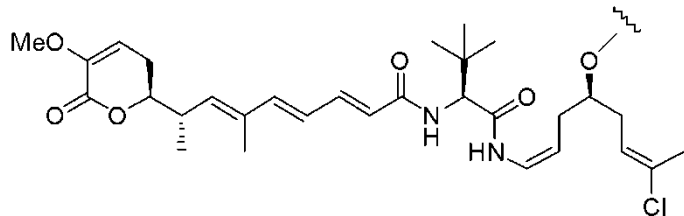
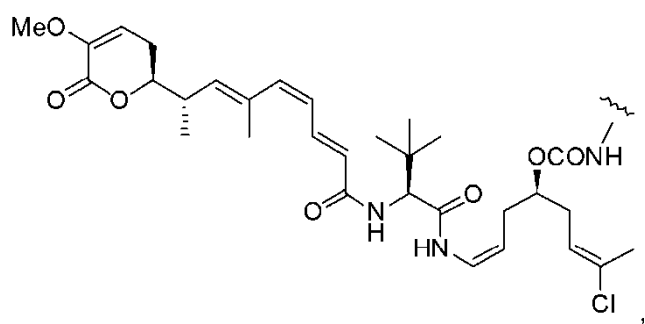
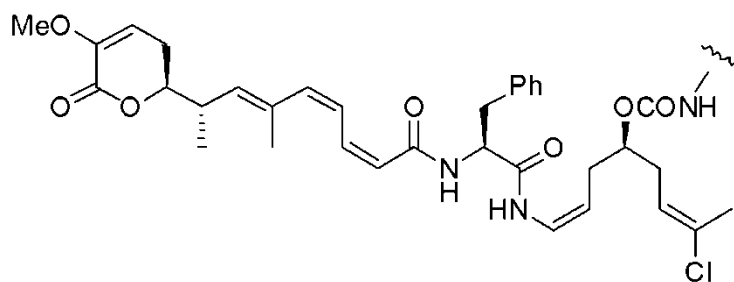
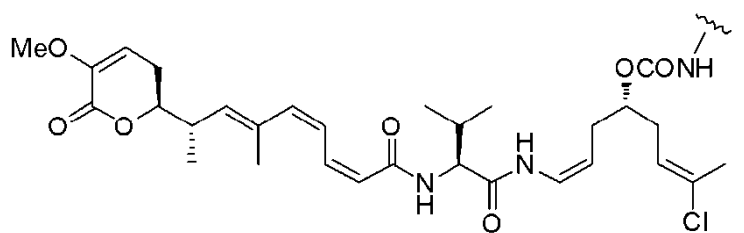


5

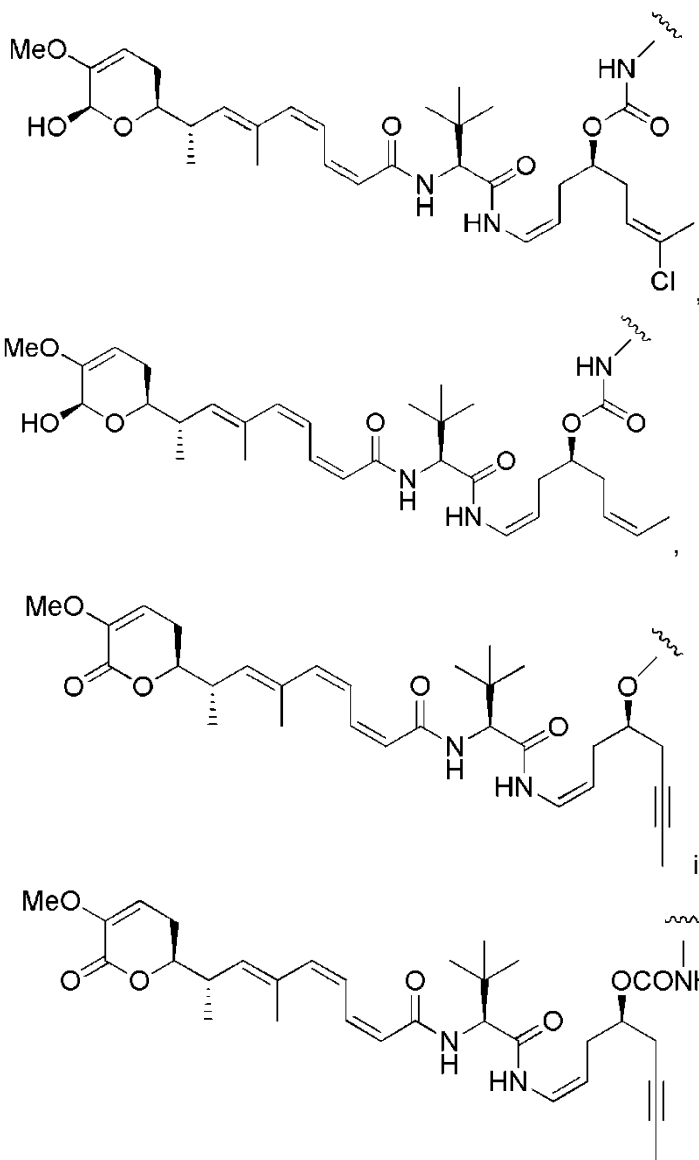




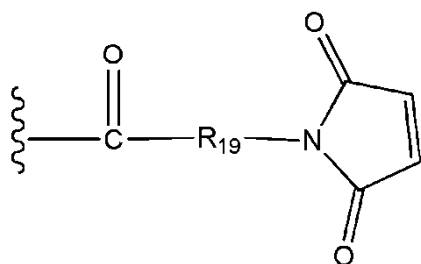
5



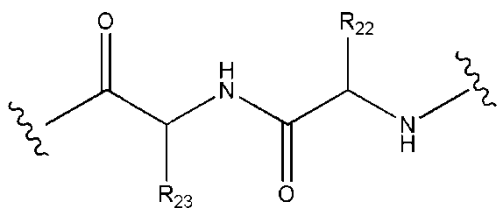
5



- 5 де хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до X;
 сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H згідно з другим аспектом даного винаходу, де:
 L₁ являє собою групу формули:



- 10 де:
 хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до X;
 R₁₉ являє собою -C₅-алкілен-;
 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді (AA)_w являє собою формулу (III):

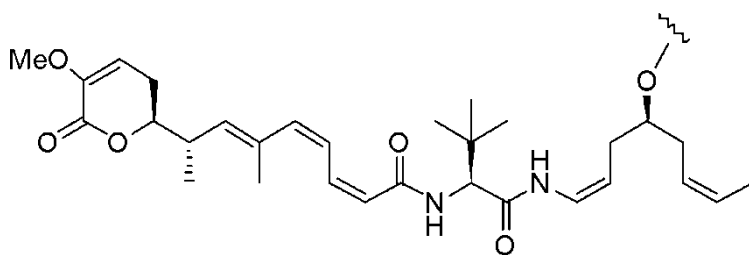
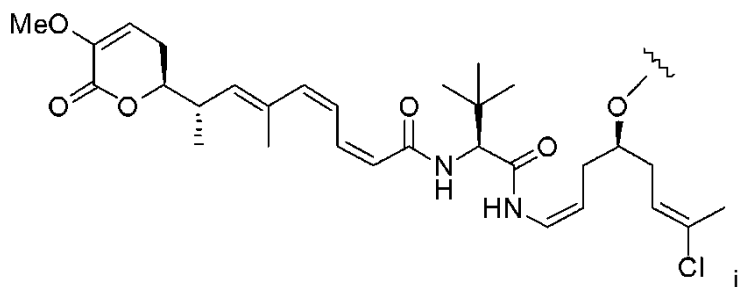


(III)

де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують точку ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

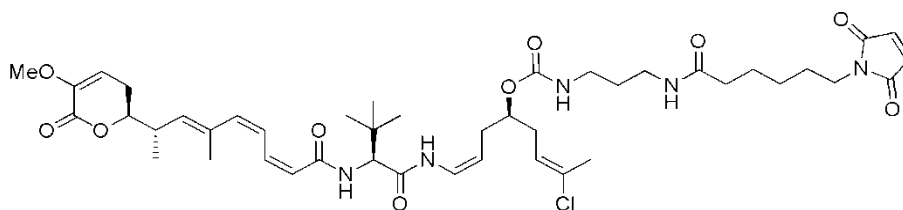
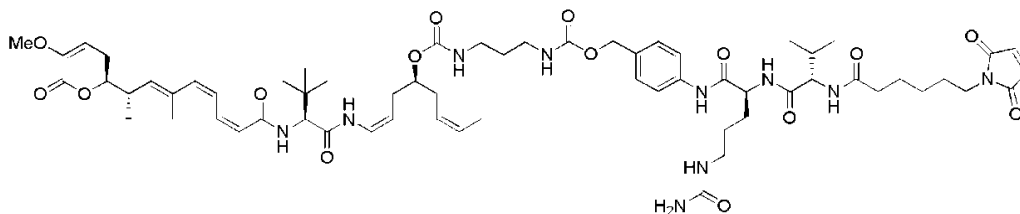
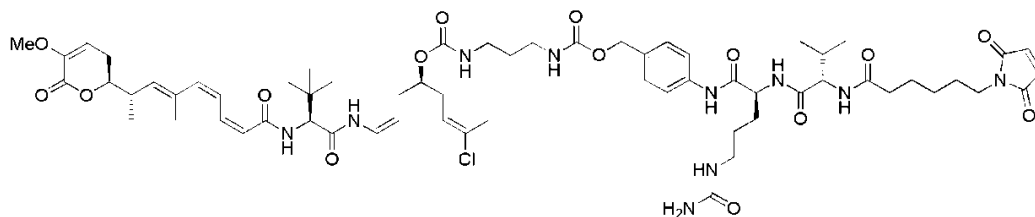
- 5 X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-CONH(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH-, $-CONH(CH_2)_3NH-$, $-CONH(CH_2)_3S-$ і $-CONH(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S-$; і

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:

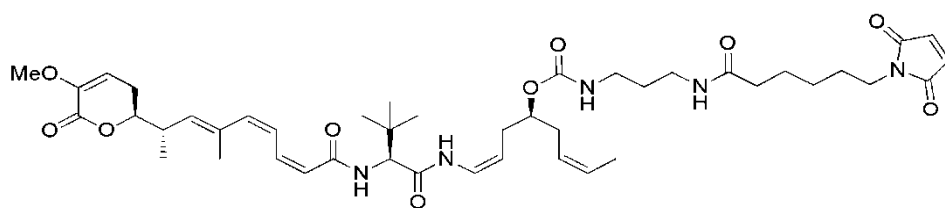


10

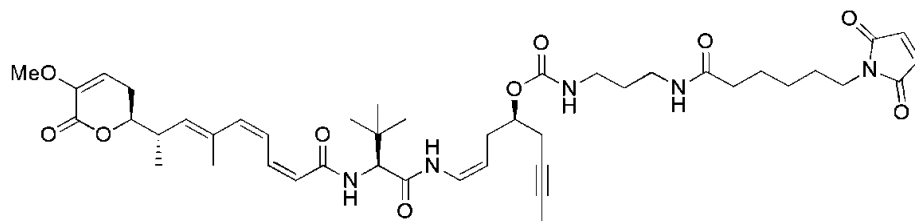
де хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до X; сполуку формули D-X-(AA)_w-L₁, вибрану з:



15

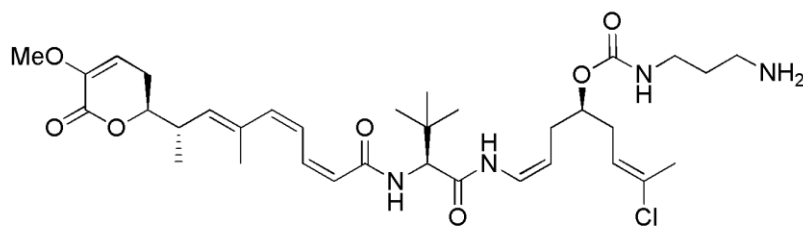


i

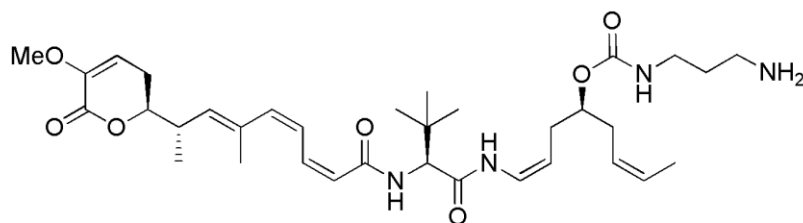


;

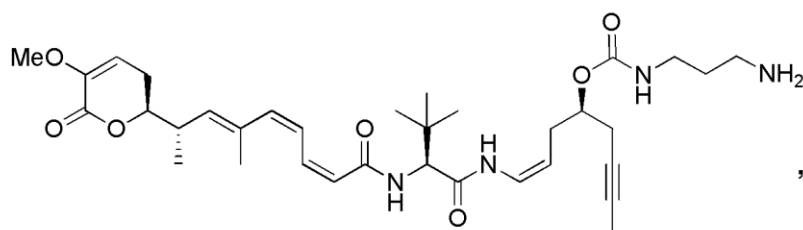
сполуку формули D-X-(AA)_w-H, вибрану з:



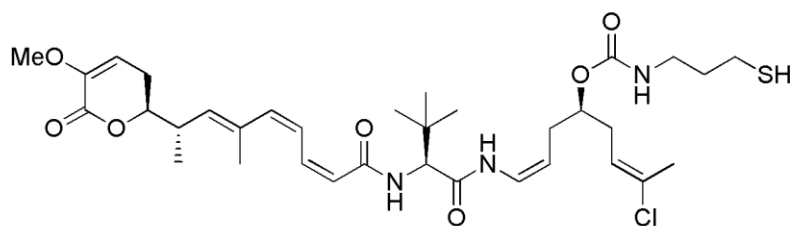
,



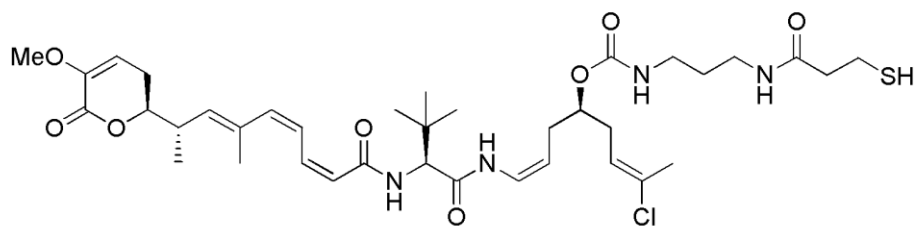
,



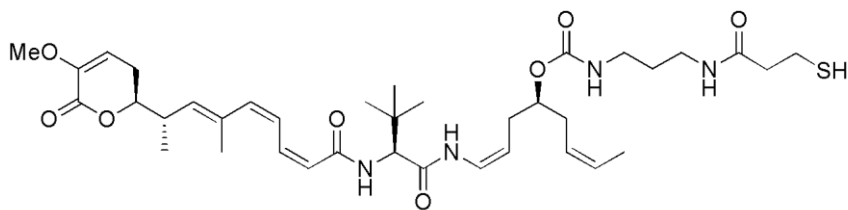
,



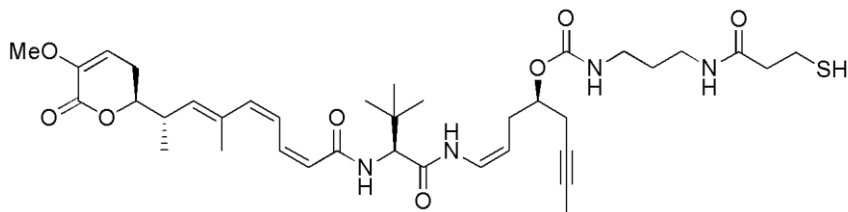
,



,



i



Термін "фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, сольвати, таутомери або стереоізомери" у кон'югатах лікарського засобу за даним винаходом стосується будь-якої фармацевтично прийнятної солі, складного ефіру, сольвату, гідрату або стереоізомерної форми або будь-якої іншої сполуки, яка, при введенні пацієнту, здатна забезпечувати сполуку, описану в даній заявці, або безпосередньо, або опосередковано. Однак варто мати на увазі, що фармацевтично неприйнятні солі також входять в обсяг винаходу, оскільки вони можуть бути корисні в одержанні фармацевтично прийнятних солей. Одержання солей, проліків і похідних можна здійснити за допомогою способів, відомих у даній галузі.

Наприклад, фармацевтично прийнятні солі сполук, представлені в даній заявці, синтезують з вихідної сполуки, що містить основну або кислотну групу, звичайними хімічними способами. Як правило, такі солі, наприклад, одержують шляхом взаємодії форм вільної кислоти або основи цих сполук зі стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або в органічному розчиннику або в суміші двох розчинників. Як правило, переважні неводні середовища, такі як ефір, етилацетат, етанол, ізопропанол або ацетонітрил. Приклади кислотно-адитивних солей включають адитивні солі мінеральних кислот, такі як, наприклад, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, сульфат, нітрат, фосфат, і адитивні солі органічної кислоти, такі як, наприклад, ацетат, трифторацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, малат, манделат, метансульфонат і пара-толуолсульфонат. Приклади основно-адитивних солей включають неорганічні солі, такі як, наприклад, солі натрію, калію, кальцію й амонію, і солі органічних основ, таких як, наприклад, етилендіамін, етаноламін, N, N-діалкіленетаноламін, триетаноламін, і солі основних амінокислот.

Кон'югати лікарського засобу за даним винаходом можуть бути в кристалічній формі, або у вигляді вільних сполук, або у вигляді сольватів (наприклад, гідратів), і передбачається, що обидві форми входять в обсяг даного винаходу. Способи сольватування широко відомі в даній галузі.

Будь-яка сполука, що являє собою проліки кон'югованого лікарського засобу за даним винаходом, знаходиться в рамках обсягу і суті винаходу. Термін "проліки" використовується в найбільш широкому розумінні й охоплює ті похідні, які перетворюються *in vivo* у сполуки за даним винаходом. Такі похідні будуть очевидні фахівцям у даній галузі і включають, наприклад, сполуки, у яких вільна гідроксигрупа перетворена в складноефірне похідне. Багато які придатні проліки добре відомі фахівцям у даній галузі і їх можна знайти, наприклад, у Burger "Medicinal Chemistry and Drug Discovery" 6th ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) і "Design and Applications of Prodrugs" (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers), зміст яких включений в дану заявку за допомогою посилання.

Стосовно сполук за даним винаходом, фармакологічно прийнятні складні ефіри не особливо обмежені і можуть бути вибрані звичайним фахівцем у даній галузі. У випадку зазначених складних ефірів, переважно, щоб такі складні ефіри могли розщеплюватися під впливом біологічного процесу, такого як гідроліз, *in vivo*. Група, що утворює зазначені складні ефіри (група, показана як R, коли складні ефіри виражені як -COOR), може бути, наприклад, C₁-C₄-алкокси-C₁-C₄-алкільною групою, такою як метоксіетил, 1-етоксіетил, 1-метил-1-метоксіетил, 1-

(ізопропоксі)етил, 2-метоксіетил, 2-етоксіетил, 1,1-диметил-1-метоксиметил, етоксиметил, пропоксиметил, ізопропоксиметил, бутоксиметил або трет-бутоксиметил; C₁-C₄-алкоксикованою C₁-C₄-алкоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як 2-метоксіетоксиметил; C₆-C₁₀-арилоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як феноксиметил; галогенованою C₁-C₄-алкоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як 2,2,2-трихлоретоксиметил або біс(2-хлоретокси)метил; C₁-C₄-алкоксикарбонілC₁-C₄-алкільною групою, такою як метоксикарбонілметил; ціаноC₁-C₄-алкільною групою, такою як ціанометил або 2-ціаноетил; C₁-C₄-алкілтіометильною групою, такою як метилтіометил або етилтіометил; C₆-C₁₀-арилтіометильною групою, такою як фенілтіометил або нафтилтіометил; C₁-C₄-алкілсульфонілC₁-C₄-алкільною групою, що може бути необов'язково заміщеною атомом (атомами) галогену, такою як 2-метансульфонілетил або 2-трифторметансульфонілетил; C₆-C₁₀-арилсульфонілC₁-C₄-алкільною групою, такою як 2-бензолсульфонілетил або 2-толуолсульфонілетил; C₁-C₇-аліфатичною ацилоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як формілоксиметил, ацетоксиметил, пропіонілоксиметил, бутирилоксиметил, півалоїлоксиметил, валерилоксиметил, ізовалерилоксиметил, гексаноїлоксиметил, 1-формілоксіетил, 1-ацетоксіетил, 1-пропіонілоксіетил, 1-бутирилоксіетил, 1-півалоїлоксіетил, 1-валерилоксіетил, 1-ізовалерилоксіетил, 1-гексаноїлоксіетил, 2-формілоксіетил, 2-ацетоксіетил, 2-пропіонілоксіетил, 2-бутирилоксіетил, 2-півалоїлоксіетил, 2-валерилоксіетил, 2-ізовалерилоксіетил, 2-гексаноїлоксіетил, 1-формілоксипропіл, 1-ацетоксипропіл, 1-пропіонілоксипропіл, 1-бутирилоксипропіл, 1-півалоїлоксипропіл, 1-валерилоксипропіл, 1-ізовалерилоксипропіл, 1-гексаноїлоксипропіл, 1-ацетоксибутил, 1-пропіонілоксибутил, 1-бутирилоксибутил, 1-півалоїлоксибутил, 1-ацетоксипентил, 1-пропіонілоксипентил, 1-бутирилоксипентил, 1-півалоїлоксипентил або 1-півалоїлоксигексил; C₅-C₆-циклоалкілкарбонілоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як циклопентилкарбонілоксиметил, циклогексилкарбонілоксиметил, 1-циклопентилкарбонілоксіетил, 1-циклогексилкарбонілоксіетил, 1-циклопентилкарбонілоксипропіл, 1-циклогексилкарбонілоксипропіл, 1-циклопентилкарбонілоксибутил або 1-циклогексилкарбонілоксибутил; C₆-C₁₀-арилкарбонілоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як бензоїлоксиметил; C₁-C₆-алкоксикарбонілоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як метоксикарбонілоксиметил, 1-(метоксикарбонілоксі)етил, 1-(метоксикарбонілокси)пропіл, 1-(метоксикарбонілокси)бутил, 1-(метоксикарбонілокси)пентил, 1-(метоксикарбонілокси)гексил, етоксикарбонілоксиметил, 1-(етоксикарбонілоксі)етил, 1-(етоксикарбонілокси)пропіл, 1-(етоксикарбонілокси)бутил, 1-(етоксикарбонілокси)пентил, 1-(етоксикарбонілокси)гексил, пропоксикарбонілоксиметил, 1-(пропоксикарбонілоксі)етил, 1-(пропоксикарбонілокси)пропіл, 1-(пропоксикарбонілокси)бутил, ізопропоксикарбонілоксиметил, 1-(ізопропоксикарбонілоксі)етил, 1-(ізопропоксикарбонілокси)бутил, бутоксикарбонілоксиметил, 1-(бутоксикарбонілоксі)етил, 1-(бутоксикарбонілокси)пропіл, 1-(бутоксикарбонілокси)бутил, ізобутоксикарбонілоксиметил, 1-(ізобутоксикарбонілоксі)етил, 1-(ізобутоксикарбонілокси)пропіл, 1-(ізобутоксикарбонілокси)бутил, трет-бутоксикарбонілоксиметил, 1-(трет-бутоксикарбонілоксі)етил, пентилоксикарбонілоксиметил, 1-(пентилоксикарбонілоксі)етил, 1-(пентилоксикарбонілокси)пропіл, гексилоксикарбонілоксиметил, 1-(гексилоксикарбонілоксі)етил або 1-(гексилоксикарбонілокси)пропіл; C₅-C₆-циклоалкілоксикарбонілоксіC₁-C₄-алкільною групою, такою як циклопентилоксикарбонілоксиметил, 1-(циклопентилоксикарбонілоксі)етил, 1-(циклопентилоксикарбонілокси)пропіл, 1-(циклопентилоксикарбонілокси)бутил, циклогексилоксикарбонілоксиметил, 1-(циклогексилоксикарбонілоксі)етил, 1-(циклогексилоксикарбонілокси)пропіл або 1-(циклогексилоксикарбонілокси)бутил; [5-(C₁-C₄-алкіл)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метильною групою, такою як (5-метил-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил, (5-етил-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил, (5-пропіл-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил, (5-ізопропіл-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил або (5-бутил-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил; [5-(феніл, що може бути необов'язково заміщений C₁-C₄-алкілом, C₁-C₄-алкокси або атомом (атомами) галогену)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метильною групою, такою як (5-феніл-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метил, [5-(4-метилфеніл)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метил, [5-(4-метоксифеніл)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метил, [5-(4-фторфеніл)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метил або [5-(4-хлорфеніл)-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл]метил; або фталідильною групою, що може бути необов'язково заміщеною C₁-C₄-алкільною або C₁-C₄-алкоксигрупою(ами), такою як фталідил, диметилфталідил або диметоксифталідил, і переважно являє собою півалоїлоксиметильну групу, фталідильну групу або (5-метил-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метильну групу, більш переважно (5-метил-2-оксо-1,3-діоксолен-4-іл)метильну групу.

Будь-яка сполука, зазначена в даній заявці, призначена для представлення такої конкретної сполуки, а також деяких варіантів або форм. Зокрема, сполуки, зазначені в даній заявці, можуть мати асиметричні центри і тому можуть існувати в різних енантіомерних формах. Всі оптичні

ізомери і стереоізомери сполук, зазначених у даній заявці, і їх суміші розглядаються в рамках даного винаходу. Таким чином, будь-яка дана сполука, зазначена в даній заявці, призначена для представлення будь-якої з форм, вибраних з рацемату, однієї або декількох енантіомерних форм, однієї або декількох діастереомерних форм, однієї або декількох атропоізомерних форм і їх сумішей. Зокрема, кон'югати лікарського засобу формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ і сполуки формули $D-X-(AA)_w-L_1$ або $D-X-(AA)_w-H$ можуть включати енантіомери залежно від їх асиметрії або діастереоізомери. Стереоізомерія навколо подвійного зв'язку також можлива, тому в деяких випадках молекула може існувати у вигляді (E)-ізомеру або (Z)-ізомеру. Якщо молекула містить декілька подвійних зв'язків, кожен подвійний зв'язок буде мати свою власну стереоізомерію, що може бути такою ж або відмінною від стереоізомерії інших подвійних зв'язків у молекулі. Окремі ізомери і суміші ізомерів входять в обсяг даного винаходу.

Крім того, сполуки, зазначені в даній заявці, можуть існувати у вигляді геометричних ізомерів (тобто цис- і транс-ізомери), у вигляді таутомерів або у вигляді атропоізомерів. Зокрема, термін таутомер стосується одного з двох або декількох структурних ізомерів сполуки, які існують у рівновазі і легко перетворюються з однієї ізомерної форми в іншу. Розповсюджені таутомерні пари являють собою амін-імін, амід-імід, кето-енол, лактам-лактим і інші. Крім цього, будь-яка сполука, зазначена в даній заявці, призначена для представлення гідратів, сольватів і поліморфів і їх сумішей, коли такі форми існують у даному середовищі. Крім того, сполуки, зазначені в даній заявці, можуть існувати в ізотопно мічених формах. Усі геометричні ізомери, таутомери, атропоізомери, гідрати, сольвати, поліморфи і ізотопно мічені форми сполук, зазначені в даній заявці, і їх суміші включені в обсяг даного винаходу.

У сполуках за даним винаходом, Ab являє собою компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт. В альтернативному варіанті втілення, Ab може являти собою будь-який придатний агент, що здатний до зв'язування з клітиною-мішенню, переважно з клітиною тварини, більш переважно з клітиною людини. Приклади таких агентів включають лімфокіни, гормони, фактори росту і молекули-переносники біогенних речовин (наприклад, трансферин).

Коли Ab являє собою компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, такий компонент переважно являє собою антигензв'язувальний пептид або поліпептид. У переважному варіанті втілення, такий компонент являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент.

Термін "антитіло" у кон'югатах лікарського засобу за даним винаходом стосується будь-якого імуноглобуліну, переважно повнорозмірного імуноглобуліну. Переважно термін охоплює моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла, і фрагменти антитіл, за умови, що вони виявляють бажану біологічну активність. Антитіла можуть походити з будь-яких видів, але переважно мають походження від гризунів, наприклад щурів або мишей, або кролика і людини. Альтернативно, антитіла, переважно моноклональні антитіла, можуть бути гуманізованими, химерними або фрагментами таких антитіл. Термін "химерні антитіла" також може включати "приматизовані" антитіла, що включають різні послідовності антигензв'язувальних доменів, що походять з відмінного від людини примата (наприклад, мавпи й інших), і послідовності константної області людини. Імуноглобуліни також можуть являти собою будь-який тип (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD і IgA), клас (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підклас молекули імуноглобуліну.

Термін "моноклональне антитіло" стосується практично гомогенної популяції молекул антитіл (тобто індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які можуть бути присутні у незначних кількостях), продукованої одним клоном В-клітин, часто гібридомою. Важливо, що кожне моноклональне антитіло має однакову антигенну специфічність, тобто воно спрямовано проти однієї детермінанти на антигені.

Одержання моноклональних антитіл можна здійснити за допомогою способів, відомих у даній галузі. Однак, як приклад, моноклональні антитіла можуть бути одержані методом гібридом (Kohler et al. (1975), Nature, 256:495), методом В-клітинної гібридоми людини (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) або методом EBV-гібридоми (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Альтернативно, моноклональне антитіло може бути одержане з використанням методів рекомбінантної ДНК (див., US 4816567) або виділене з фагових бібліотек антитіл з використанням методів, описаних у Clackson et al. (1991), Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991), J. Mo. Biol., 222:581-597.

Поліклональні антитіла являють собою антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів). Ця гетерогенна популяція антитіла може бути одержана із сироватки крові вакцинованих тварин з використанням різних процедур, добре відомих у даній галузі.

Термін "біспецифічне антитіло" стосується штучного антитіла, що складається з двох різних моноклональних антитіл. Вони можуть бути призначені або для зв'язування з двома сусідніми епітопами на одному антигені, тим самим збільшуючи як авідність, так і специфічність, або зв'язування з двома різними антигенами для множини різних змін, але особливо для рекрутингу цитотоксичних Т- і природних кілерних клітин (NK) або переорієнтування токсинів, радіонуклідів або цитотоксичних лікарських засобів для лікування раку (Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, 9, 23). Біспецифічне антитіло може мати гібрид важкого ланцюга імуноглобуліну з першою специфічністю зв'язування в одному відгалуженні і гібрид пари важкого ланцюга-легкого ланцюга імуноглобуліну (що забезпечує другу специфічність зв'язування) в іншому відгалуженні. Ця асиметрична структура полегшує відділення бажаної біспецифічної сполуки від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобуліну, оскільки наявність легких ланцюгів імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули забезпечує легкий шлях відділення (WO 94/04690; Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210; Rodrigues et al., 1993, *J. of Immunology* 151:6954-6961; Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167; Carter et al., 1995, *J. of Hematotherapy* 4:463-470; Merchant et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681).

Способи одержання гібриду або біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. В одному способі, біспецифічні антитіла можуть бути одержані шляхом злиття двох гібридом в одну "квадрому" шляхом хімічного зшивання або генетичного злиття двох різних модулів Fab або scFv (Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, 9, 23).

Термін "химерне" антитіло стосується антитіла, у якому різні частини походять з різних видів тварин. Наприклад, химерне антитіло може мати варіабельну область мишачого походження і константну область людського походження. З іншого боку, "гуманізоване антитіло" переважно має людське походження, навіть якщо воно містить частини, що походять не від людини. Конкретніше, гуманізовані антитіла являють собою людські імуноглобуліни (реципієнтне антитіло), у яких залишки з гіперваріабельної області реципієнта замінені залишками з гіперваріабельних областей нелюдських видів (донорське антитіло), таких як миша, щур, кролик або відмінний від людини примат, що мають бажану специфічність, афінність і здатність. У деяких випадках, залишки каркасної області (FR) людського імуноглобуліну замінені відповідними залишками відмінних від людини видів. Крім того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, що не виявлені в реципієнтному антитілі або в донорському антитілі. Ці модифікації здійснюються для подальшого поліпшення функціонування антитіла. Загалом, гуманізоване антитіло буде включати по суті всі з щонайменше одного і звичайно двох варіабельних доменів, у яких всі або по суті всі з гіперваріабельних петель відповідають тим, які присутні в нелюдському імуноглобуліні, і всі або по суті всі з FRs являють собою такі, які мають послідовність імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також буде включати щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), типово імуноглобуліну людини.

Рекомбінантні антитіла, такі як химерні і гуманізовані моноклональні антитіла, можуть бути одержані за допомогою методів рекомбінантної ДНК, відомих у даній галузі. Повністю людські антитіла можуть бути одержані з використанням трансгенних мишей, що не можуть експресувати гени важкого і легкого ланцюгів ендogenous імуноглобуліну, але які можуть експресувати гени важкого і легкого ланцюгів людини. Трансгенних мишей імунізували звичайним способом вибраним антигеном. Моноклональні антитіла, спрямовані проти антигену, можуть бути одержані з використанням звичайної гібридомної технології. Трансгени імуноглобуліну людини, накопичені у трансгенних мишей, піддаються перегрупованню в процесі В-клітинної диференціації і потім відбувається переключення класу і соматична мутація. Таким чином, з використанням такого методу можна одержати терапевтично корисні IgG, IgA, IgM і IgE антитіла. Для огляду цієї технології для одержання антитіл людини, див. Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Докладне обговорення цієї технології для одержання людських антитіл і моноклональних людських антитіл і протоколи для одержання таких антитіл див., наприклад, у Патентах США №№ 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; кожний з яких включений у дану заяву за допомогою посилання у всій повноті. Інші людські антитіла можуть бути одержані комерційно, наприклад, від компанії Abgenix, Inc. (Freemont, CA) і Genpharm (San Jose, CA).

Термін "антигензв'язувальний фрагмент" у кон'югатах лікарського засобу за даним винаходом стосується частини повнорозмірного антитіла, де такі антигензв'язувальні фрагменти антитіл зберігають антигензв'язувальну функцію відповідного повнорозмірного антитіла. Антигензв'язувальний фрагмент може включати частину варіабельної області антитіла, при цьому така частина містить щонайменше одну, дві, переважно три CDR, вибрані з

CDR1, CDR2 і CDR3. Антигензв'язувальний фрагмент також може включати частину легкого і важкого ланцюгів імуноглобуліну. Приклади фрагментів антитіл включають Fab, Fab², F(ab')₂, scFv, di-scFv і BiTE (біспецифічні задіючі Т-клітини), Fv-фрагменти, включаючи нанотіла, діатіла, діатіло-Fc гібриди, триатіла і тетратіла; міні-тіла; лінійні антитіла; фрагменти, одержані з використанням бібліотеки Fab експресії, антиідіотипічних (анти-Id) антитіл, CDR (область, що визначає комплементарність) і епітопзв'язувальних фрагментів будь-якого з зазначених вище, які імуноспецифічно зв'язуються з цільовим антигеном, таким як антигени ракової клітини, вірусні антигени або мікробні антигени, молекул одноланцюжкових або однодоменних антитіл, включаючи антитіла, що містять тільки важкий ланцюг, наприклад VHH-домени верблюда і V-NAR акули; і мультиспецифічних антитіл, утворених із фрагментів антитіла. Для порівняння, повнорозмірне антитіло, назване "антитіло", являє собою антитіло, що включає VL- і VH-домени, а також повні константні області легких і важких ланцюгів.

Антитіло також може мати одну або декілька ефекторних функцій, що належать до біологічних активностей, обумовлених Fc-областями (Fc-область нативної послідовності або Fc-область варіанта амінокислотної послідовності, сконструйовані згідно зі способами, відомими з рівня техніки, для зміни зв'язування з рецептором) антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають Clq-зв'язування; комплементзалежну цитотоксичність; зв'язування Fc-рецептора; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; від'ємну негативну модуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинний рецептор; BCR) і т. п.

Антитіло також може являти собою функціонально активний фрагмент, похідне або аналог антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з цільовим антигеном, таким як антиген ракової клітини, вірусний антиген або мікробний антиген, або інші антитіла, що зв'язуються з пухлинними клітинами. У зв'язку з цим, "функціонально активний" означає, що фрагмент, похідне або аналог здатні індукувати антиідіотипічні антитіла, які розпізнають той же антиген, що розпізнається антитілом, з якого одержаний фрагмент, похідне або аналог. Більш конкретно, у прикладі здійснення даного винаходу антигенність ідіотипу молекули імуноглобуліну може бути посилена шляхом делеції каркасної і CDR послідовностей, що є C-кінцевими відносно CDR послідовності, яка специфічно розпізнає антиген. Для визначення, які CDR послідовності зв'язуються з антигеном, синтетичні пептиди, що містять CDR послідовності, можуть бути використані в аналізах зв'язування з антигеном з використанням будь-якого методу здійснення аналізу зв'язування, відомого в даній галузі (наприклад, BIA-аналіз ядра), див., наприклад, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al., 1980, J. of Immunology 125(3):961-969.

Термін "антитіло" також може включати гібридний білок антитіла або його функціонально активний фрагмент, наприклад, де злиття антитіла відбувається через ковалентний зв'язок (наприклад, пептидний зв'язок), або на N-кінці, або на C-кінці, з амінокислотною послідовністю іншого білка (або її частиною, такою як щонайменше частина білка з 10, 20 або 50 амінокислот), що не є антитілом. Антитіло або його фрагмент можуть бути ковалентно зв'язані з іншим білком на N-кінці константного домену.

Крім того, антитіло або антигензв'язувальні фрагменти за даним винаходом можуть включати аналоги і похідні антитіл або їх антигензв'язувальні фрагменти, модифіковані, наприклад, шляхом ковалентного приєднання будь-якого типу молекули, за умови, що таке ковалентне приєднання дає можливість антитілу зберегти його антигензв'язувальну імуноспецифічність. Приклади модифікацій включають глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідування, дериватизацію відомими захисними/блокувальними групами, протеолітичне розщеплення, зв'язування з клітинною одиницею антитіла або іншим білком і т. п. Будь-яку з численних хімічних модифікацій можна здійснювати відомими способами, включаючи, але не обмежуючись цим, специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез у присутності тунікаміцину і інші. Крім цього, аналог або похідне може містити одну або декілька амінокислот, що не зустрічаються в природі.

Антитіла або антигензв'язувальні фрагменти за даним винаходом також можуть мати модифікації (наприклад, заміщення, делеції або вставки) у Fc-домени антитіла. Більш конкретно, модифікації можуть бути в Fc-шарнірній області і приводити до підвищення зв'язування відносно FcRn-рецептора (WO 97/34631).

В одному варіанті втілення даного винаходу, антитіло в кон'югаті лікарського засобу за даним винаходом може являти собою будь-яке антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, переважно моноклональне антитіло, що є корисним для лікування захворювання, переважно раку. Рак може являти собою рак молочної залози, колоректальний рак, рак

ендометрія, рак нирки, лейкемії, рак легень, множинну мієлому, солідні пухлини, такі як лімфоми (наприклад, хвороба Ходжкіна і неходжкінська лімфома), саркому і карциноми, меланому, мезотеліому, остеосаркому, рак яєчників і рак нирки. У переважному варіанті втілення рак являє собою рак легень, колоректальний рак, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак нирки, лейкоз, множинну мієлому, лімфому і рак яєчників. У більш переважному варіанті втілення рак являє собою колоректальний рак, рак молочної залози, лейкоз, лімфому і рак яєчників.

Антитіла, які можуть бути корисними для лікування раку, включають, але не обмежуються цим, антитіла проти наступних антигенів: CA125 (оваріальний), CA15-3 (карциноми), CA19-9 (карциноми), L6 (карциноми), Lewis Y (карциноми), Lewis X (карциноми), альфа-фетобілок (карциноми), CA242 (колоректальний), плацентарна лужна фосфатаза (карциноми), специфічний антиген простати (простата), простатична кисла фосфатаза (простата), епідермальний фактор росту (карциноми), наприклад рецепторний білок 2 EGF (рак молочної залози), MAGE-I (карциноми), MAGE-2 (карциноми), MAGE-3 (карциноми), MAGE-4 (карциноми), антитрансферинний рецептор (карциноми), p97 (меланома), MUCI-KLH (рак молочної залози), CEA (колоректальний), gp100 (меланома), MART1 (меланома), PSA (простата), IL-2-рецептор (Т-клітинний лейкоз і лімфоми), CD20 (неходжкінська лімфома), CD52 (лейкоз), CD33 (лейкоз), CD22 (лімфома), хоріонічний гонадотропін людини (карцинома), CD38 (множинна мієлома), CD40 (лімфома), муцин (карциноми), P21 (карциноми), MPG (меланома) і Neu онкогенний продукт (карциноми). Деякі специфічні корисні антитіла включають, але не обмежуються цим, BR96 mAb (Trail P.A. et al. Science (1993), 261, 212-215), BR64 (Trail P.A. et al. Cancer Research (1997), 57, 100-105), mAbs проти CD40 антигену, такі як S2C6 mAb (Francisco J.A. et al. Cancer Res. (2000), 60:3225-3231), mAbs проти CD70 антигену, такі як 1F6 mAb, і mAbs проти CD30 антигену, такі як AC10 (Bowen M.A. et al. (1993), J. Immunol., 151:5896-5906; Wahl et al., 2002 Cancer Res. 62(13):3736-42). Багато які інші інтерналізовані антитіла, що зв'язуються з пухлиноасоційованими антигенами, можуть бути використані і були описані в літературі (Franke A.E. et al. Cancer Biother Radiopharm. (2000), 15:459-76; Murray J.L. (2000), Semin Oncol, 27:64-70; Breitling F. and Dubel S., Recombinant antibody, John Wiley, and Sons, New York, 1998).

Інші пухлиноасоційовані антигени включають, але не обмежуються цим, BMPR1B, E16, STEAP1, STEAP2, 0772P, MPF, Napi3b, Sema5b, PSCA hlg, ETBR, MSG783, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79b, FcRH2, HER2, NCA, MDP, IL20R α , Brevican, EphB2R, ASLG659, PSCA, GEDA, BAFF-R, CD79A, CXCR5, HLA-DOB, P2 \times 5, CD72, LY64, FCRH1, IRTA2 і TENB2.

В альтернативному варіанті втілення, антитіло в кон'югаті лікарського засобу за даним винаходом може являти собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, переважно моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з вірусним антигеном, мікробним антигеном або антигеном клітини, що продукує аутоімунні антитіла, пов'язані з аутоімунним захворюванням.

Вірусний антиген може включати, але не обмежується цим, будь-який вірусний пептид, поліпептид або білок, такий як HIV gp120, HIV nef, RSV F глікопротеїн, нейрамінідаза вірусу грипу, гемаглютинін вірусу грипу, HTLV tax, глікопротеїн вірусу простого герпесу (наприклад, Gb, Gc, Gd і Ge) і поверхневий антиген гепатиту В, що може викликати імунну відповідь.

Мікробний антиген може включати, але не обмежується цим, будь-який мікробний пептид, поліпептид, білок, сахарид, полісахарид або ліпідну молекулу (наприклад, бактеріальний, грибовий, патогенний протозойний або дріжджовий поліпептид, включаючи, наприклад, LPS і капсулярний полісахарид), що може викликати імунну відповідь.

В іншому варіанті втілення даного винаходу, антитіло може являти собою будь-яке антитіло, відоме для лікування або профілактики вірусної або мікробної інфекції, тобто інфекційного захворювання. Приклади таких антитіл включають, але не обмежуються цим, PRO542 (Progenies), що являє собою CD4 зливе антитіло, корисне для лікування HIV-інфекції; OsTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA), що являє собою людське антитіло, корисне для лікування вірусу гепатиту В; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA), що являє собою гуманізоване IgG1 антитіло, корисне для лікування цитомегаловірусу (CMV); і анти-LPS антитіла.

Інші антитіла, корисні для лікування інфекційних захворювань, включають, але не обмежуються цим, антитіла проти антигенів з патогенних штамів бактерій (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio colerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* (*Vibrio*) *fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*,

Salmonella typhimurium, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*); патогенні гриби (5 *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); найпростіші (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*) або гельмінти (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* і нематоди).

Інші антитіла, корисні для лікування вірусних захворювань, включають, але не обмежуються цим, антитіла проти антигенів патогенних вірусів, включаючи як приклади і без обмеження: 15 поксвірус, вірус герпесу, вірус простого герпесу 1, вірус простого герпесу 2, аденовірус, паповавірус, ентеровірус, пікорнавірус, парвовірус, реовірус, ретровірус, віруси грипу, віруси парагрипу, паротит, кір, респіраторно-синцитіальний вірус, краснуху, арбовірус, рабдовірус, аренавірус, вірус гепатиту А, вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, вірус гепатиту Е, вірус "ні А, ні В"-гепатиту, риновірус, коронавірус, ротавірус і вірус імунodefіциту людини.

В альтернативному варіанті втілення, антитіло кон'югата лікарського засобу за даним винаходом також може являти собою будь-яке антитіло, відоме для лікування або профілактики аутоімунних розладів, таких як, але не обмежуючись цим, Th2 лімфоцитозалежні розлади (наприклад, atopічний дерматит, atopічна астма, ринокон'юнктивіт, алергічний риніт, синдром Оменна, системний склероз і реакція "трансплантат проти хазяїна"); Th1 лімфоцитозалежні 25 розлади (наприклад, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, псоріаз, синдром Шегрена, тиреоїдит Хашимото, хвороба Грейвса, первинний біліарний цироз, гранулематоз Вегенера і туберкульоз); активований В-лімфоцитозалежні розлади (наприклад, системний червоний вовчак, синдром Гудпасчера, ревматоїдний артрит і діабет I типу) і активний хронічний гепатит, хвороба Аддісона, алергічний альвеоліт, алергічні реакції, алергічний риніт, синдром Альпорта, анафілаксія, анкілозуючий спондиліт, антифосфоліпідний синдром, артрит, аскаридоз, аспергілез, atopічні алергії, atopічний дерматит, atopічний риніт, хвороба Бехчета, легенева алергія птахівників, бронхіальна астма, синдром Каплана, кардіоміопатія, глютенчутлива ціліакія, хвороба Чагаса, хронічний гломерулонефрит, синдром Когана, хвороба холодних аглютинінів, інфекційна уроджена краснуха, CREST-синдром, хвороба Крона, кріоглобулінемія, 35 синдром Кушинга, дерматоміозит, дискоїдний вовчак, синдром Дресслера, синдром Ітона-Ламберта, еховірусна інфекція, енцефаломієліт, ендокринна офтальмопатія, вірусна інфекція Епштейна-Барра, Equine Heaves, еритематоз, синдром Евана, синдром Фелті, фіброміалгія, цикліт Фукса, атрофія шлунка, шлунково-кишкові алергічні реакції, великоклітинний артеріїт, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, реакція "трансплантат проти хазяїна", хвороба Грейва, хвороба Гієна-Барре, тиреоїдит Хашимото, гемолітична анемія, пурпура Шенлейна-Геноха, ідіопатична атрофія надниркових залоз, ідіопатичний легеневий фібрит, IgA нефропатія, запальні захворювання кишечника, інсулінозалежний цукровий діабет, ювенільний артрит, ювенільний цукровий діабет (тип I), ламініт, плоский лишай, люпоїдний гепатит, вовчак, лімфопенія, синдром Мен'єра, змішане захворювання сполучної тканини, розсіяний склероз, 45 важка міастенія, перніціозна анемія, полігландулярні синдроми, пресенільна деменція, первинна агаммаглобулінемія, первинний біліарний цироз, псоріаз, псоріатичний артрит, синдром Рейно, невиношування вагітності, синдром Рейтера, гостра ревматична пропасниця, ревматоїдний артрит, синдром Семптера, шистосомоз, синдром Шмідта, склеродермія, синдром Шульмана, синдром Шегрена, синдром scuтої людини, симпатична офтальмія, системний червоний вовчак, синдром Такаясу, скроневий артеріїт, тиреоїдит, тромбоцитопенія, 50 тиреотоксикоз, токсичний епідермальний некроліз, інсулінова резистентність типу В, діабет I типу, виразковий коліт, увеїт, вітіліго, макроглобулінемія Вальденстрема і гранулематоз Вегенера.

Антитіла, імуноспецифічні для антигену клітини, яка відповідає за продукцію аутоімунних антитіл, можуть бути одержані будь-яким способом, відомим звичайному фахівцю в даній галузі, таким як, наприклад, хімічний синтез або методи рекомбінантної експресії. Приклади аутоімунних антитіл включають, але не обмежуються цим, антинуклеарне антитіло; антитіла до двоспиральної нативної ДНК; антитіла до односпиральної натиної ДНК, антикардіоліпінове антитіло IgM, IgG; антифосфоліпідне антитіло IgM, IgG; анти-SM антитіло; антимітохондріальне антитіло; тиреоїдне антитіло; мікросомальне антитіло; тироглобулінове антитіло; анти-SCL-70;

анти-Jo; анти-U1RNP; анти-La/SSB; анти-SSA; анти-SSB; антиперитонеальноклітинне антитіло; антигістони; анти-RNP; C-ANCA; пара-ANCA; антицентромер; антифібриларин і анти-GBM антитіло.

В іншому варіанті втілення даного винаходу, антитіло кон'югата лікарського засобу за даним винаходом може являти собою антитіло, що зв'язується або з рецептором, або з рецепторним комплексом, експресованим на активованому лімфоциті, наприклад антитіло, пов'язане з аутоімунним захворюванням. Рецептор або рецепторний комплекс може включати члена суперсімейства імуноглобулінових генів, члена суперсімейства TNF-рецепторів, інтегрин, інтерлейкін, цитокиновий рецептор, хемокиновий рецептор, білок головного комплексу гістосумісності, лектин або контрольний білок комплексу. Необмежувальні приклади придатних членів суперсімейства імуноглобуліну являють собою CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD13, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-I і ICOS. Необмежувальні приклади придатних членів суперсімейства TNF-рецепторів являють собою CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-RI, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, остеопротегерин, Аро2/TRAFEL-RI, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRABL-R4 і APO-3. Необмежувальні приклади придатних інтегринів являють собою CDI Ia, CDIIb, CDIIc, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 і CD104. Необмежувальні приклади придатних лектинів являють собою лектин C-типу, S-типу і I-типу.

Антитіло, яке зв'язується з молекулярною мішенню або антигеном, що представляє інтерес, наприклад ErbB2-антигеном, являє собою антитіло, здатне зв'язуватися з таким антигеном з достатньою афінністю, такою, що антитіло є корисним для таргетування клітини, експресуючої такий антиген. Коли антитіло являє собою антитіло, що зв'язується з ErbB2, воно звичайно переважно зв'язується з ErbB2 на протилежність іншим ErbB-рецепторам і може являти собою антитіло, що суттєво не вступає в перехресні реакції з іншими білками, такими як EGFR, ErbB3 або ErbB4. У таких варіантах втілення даного винаходу, ступінь зв'язування антитіла з цими відмінними від ErbB2 білками (наприклад, зв'язування клітинної поверхні з ендогенним рецептором) буде менше 10 %, як визначено аналізом сортування клітин зі збудженою флуоресценцією (FACS) або аналізом радіоімунпреципітації (RIA). Іноді, анти-ErbB2 антитіло суттєво не вступає в перехресні реакції з білком щурів пелу, наприклад, як описано в Schechter et al., Nature, 312:513 (1984); і Drebin et al., Nature, 312:545-548 (1984).

В іншому варіанті втілення даного винаходу, антитіло кон'югата лікарського засобу або мішень за даним винаходом можуть бути вибрані з антитіла або мішені в представленій нижче таблиці. Такі антитіла є імуноспецифічними для антигену-мішені і можуть бути одержані комерційно або одержані будь-яким способом, відомим у даній галузі, таким як, наприклад, рекомбінантні методи експресії.

Таблиця 1

Терапевтичні моноклональні антитіла

Назва	Торгова назва	Мішень
3F8		GD2
8H		B7-H3
Абаговомаб		CA-125 (імітація)
Абциксимаб	ReoPro	CD41 (інтегрин альфа-IIb)
Актоксумаб		Clostridium difficile
Адаліумаб	Humira	TNF-α
Адекатумумаб		EpCAM
Афелімомаб		TNF-α
Афутузумаб		CD20
Алацизумаб пегол		VEGFR2
ALD518		IL-6
Алемтузумаб	Campath, MabCampath	CD52
Алірокумаб		NARP-1
Алтумомаб пентетат	Hybri-ceaker	CEA
Аматуксимаб		мезотелін
Анатумомаб мафенатокс		TAG-72
Аніфролумаб		інтерферон/β-рецептор

Продовження таблиці 1

Антрукінумаб		IL-13
Аполізумаб		HLA-DR β -ланцюг
Арцитумомаб	CEA-Scan	CEA
Аселізумаб		L-селектин (CD62L)
Атинумаб		RTN4
Атлізумаб (=тоцилізумаб)	Actemra, RoActemra	IL-6-рецептор
Аторолімумаб		резус-фактор
Бапінеузумаб		бета-амілоїд
Базиліксимаб	Simulect	CD25 (α -ланцюг IL-2-рецептора)
Бавітуксимаб		фосфатидилсерин
Бектумомаб	LymphoScan	CD22
Белімумаб	Benlysta, LymphoStat-B	BAFF
Бенралізумаб		CD125
Бертилімумаб		CCL11 (еотаксин-1)
Бесилесомаб	Scintimun	CEA-споріднений антиген
Бевацізумаб	Avastin	VEGF-A
Безлотоксумаб		Clostridium difficile
Біциромаб	FibriScint	фібрин II, бета-ланцюг
Бімагрумаб		ACVR2B
Біватузумаб мертанзин		CD44 v6
Блінадумомаб		CD19
Блосозумаб		SOST
Брентуксимаб ведотин		CD30 (TNFRSF8)
Бріакінумаб		IL-12, IL-23
Бродалумаб		IL-17
Цанакінумаб	Ilaris	IL-1 β
Кантузумаб		MUC1
Каплацізумаб		VWF
Капромаб пендетид	Prostascint	клітини карциноми передміхурової залози
Карлумаб		MCP-1
Катумаксомаб	Removab	EpCAM, CD3
CC49		TAG-72
Цеделізумаб		CD4
Цертолізумаб пегол	Cimzia	TNF- α
Цетуксимаб	Erbitux	EGFR
Ch, 14,18		Дисіалогангліозид (GD2)
Цитатузумаб богатокс		EpCAM
Циксутумумаб		рецептор IGF-1
Клазакізумаб		Oryctolagus cuniculus
Кленоліксимаб		CD4
Кліватузумаб тетраксетан	hPAM4-Cide	MUC1
Конатумумаб		TRAIL-R2
Концизумаб		TFPI
CR6261		гемаглютинін грипу А
Кренезумаб		1-40- β -амілоїд
Дацетузумаб		CD40
Даклізумаб	Zenapax	CD25 (α -ланцюг IL-2-рецептора)
Далотузумаб		рецептор інсуліноподібного фактора росту I
Даратумумаб		CD38 (циклічна ADP рибоза гідролаза)
Демцизумаб		DLL4
Деносумаб	Prolia	RANKL
Детумомаб		В-клітинна лімфома

Продовження таблиці 1

Дорлімомаб аритокс		невідома
Дрозитумаб		DR5
Дуліготумаб		HER3
Дупілумаб		IL4
Дусигітумаб		ILGF2
Екромексимаб		GD3 гангліозид
Екулізумаб	Soliris	C5
Едобакомаб		ендотоксин
Едреколомаб	Panorex	EpCAM
Ефалізумаб	Raptiva	LFA-1 (CD11a)
Ефунгумаб	Mycograb	Hsp90
Елделумаб		гамма-інтерфероніндукований білок
Елотузумаб		SLAMF7
Елсилімомаб		IL-6
Енаватузумаб		TWEAK-рецептор
Енлімомаб пегол		ICAM-1 (CD54)
Енокізумаб		IL9
Енотикумаб		DLL4
Енситуksимаб		5AC
Епітумамаб цитуксетан		епіціалін
Епратузумаб	LymphoCide	CD22
Ерлізумаб		ITGB2 (CD18)
Ертумаkсомаб	Rexomun	HER2/neu, CD3
Етарацизумаб	Abegrin	інтегрин $\alpha_v\beta_3$
Етролізумаб		інтегрин $\alpha_7\beta_7$
Еволокумаб		PCSK9
Ексібівірумаб		поверхневий антиген гепатиту В
Фаралімомаб		інтерфероновий рецептор
Фарлетузумаб		рецептор фолієвої кислоти 1
Фасинумаб		HNGF
FBTA05	Lymphomun	CD20
Фелвізумаб		респіраторно-синцитіальний вірус
Фезакінумаб		IL-22
Фіклатузумаб		HGF
Фігітумамаб		IGF-1-рецептор
Фланвотумаб		глікопротеїн 75
Фонтолізумаб	HuZAF	IFN- $\gamma\gamma$
Форалумаб		CD3 епсилон
Форавірумаб		глікопротеїн вірусу сказу
Фресоліумаб		TGF- β
Фулранумаб		NGF
Футуксимаб		EGFR
Галіксимаб		CD80
Ганітумаб		IGF-I
Гантенерумаб		бета-амілоїд
Гавілімомаб		CD147 (басигін)
Гемтузумаб озогаміцин	Mylotarg	CD33
Гевокізумаб		IL-1 β
Гірентуксимаб	Rencarex	карбоангідраза 9 (CA-IX)
Глембатумамаб ведотин		GNPMB
Голіумамаб	Simponi	TNF- α
Гоміліксимаб		CD23 (IgE-рецептор)
GS6624		лізілоксидазоподібний 2
Гуселкумаб		IL13
Ібалізумаб		CD4

Продовження таблиці 1

Ібритутомаб тіуксетан	Zevalin	CD20
Ікрукумаб		VEGFR-1
Іговомаб	Indimacis-125	CA-125
Імциромаб	Myoscint	серцевий міозин
Імгатузумаб		EGFR
Інклакумаб		селектин Р
Індатуксимаб равтанзин		SDC1
Інфліксимаб	Remicade	TNF- α
Інолімомаб		CD25 (α -ланцюг IL-2-рецептора)
Інотузумаб озогаміцин		CD22
Інтетумумаб		CD51
Іпілімумаб	Yervoy	CD152
Іратумумаб		CD30 (TNFRSF8)
Ітолізумаб		CD6
Іксекізумаб		IL-17A
Келіксимаб		CD4
Лабетузумаб	CEA-Cide	CEA
Ламбролізумаб		PDCD1
Лампалізумаб		CFD
Лебрикізумаб		IL-13
Лемалесомаб		NCA-90 (гранулоцитарний антиген)
Лерделімумаб		TGF бета2
Лексатумумаб		TRAIL-R2
Лібівірумаб		поверхневий антиген гепатиту В
Лігелізумаб		IGHE
Лінтузумаб	Smart M 195	CD33
Лірилумаб		KIR2D
Лоделцизумаб		PCSK9
Лорвотузумаб мертанзин		CD56
Люкатумумаб		CD40
Люміліксимаб		CD23 (IgE-рецептор)
Мапатумумаб		TRAIL-R1
Маргетуксимаб		ch4D5
Маслімомаб		Т-клітинний рецептор
Матузумаб		EGFR
Маврилімумаб		α -ланцюг GMCSF-рецептора
Меполізумаб	Bosatria	IL-5
Метелімумаб		TGF бета1
Мілатузумаб		CD74
Мінретумомаб		TAG-72
Мітумомаб		GD3 гангліозид
Могамулізумаб		CCR4
Моролімумаб		резус-фактор
Мотавізумаб	Numax	респіраторно-синцитіальний вірус
Моксетумумаб пасудотокс		CD22
Муромонаб-CD3	Orthoclone OKT3	CD3
Наколомаб тафенатокс		C242 антиген
Намілумаб		CSF2
Наптумомаб		5T4
Нарнатумаб		RON
Наталізумаб	Tysabri	інтегрин α_4
Небакумаб		ендотоксин
Нецитумумаб		EGFR
Нерелімомаб		TNF- α
Несвакумаб		ангіопоетин 2

Продовження таблиці 1

Німотузумаб	Theracim, Theraloc	EGFR
Ніволумаб		IgG4
Нофетумомаб		?
Окаратузумаб		CD20
Окрелізумаб		CD20
Одулімомаб		LFA-1 (CD11a)
Офатумумаб	Arzerra	CD20
Оларатумаб		PDGF-R α
Олокізумаб		IL6
Омалізумаб	Xolair	IgE Fc-область
Онартузумаб		рецепторна кіназа фактора росту гепатоцитів людини
Опортузумаб		EpCAM
Ореговомаб	OvaRex	CA-125
Ортикумаб		oxLDL
Отеліксизумаб		CD3
Окселумаб		OX-40
Озанезумаб		NOGO-A
Озоралізумаб		Lama glama
Пагібаксимаб		ліпотейхоєва кислота
Палівізумаб	Synagis, Abbosynagis	F-білок респіраторно-синцитіального вірусу
Панітумумаб	Vectibix	EGFR
Панобакумаб		Pseudomonas aeruginosa
Парсаузумаб		EGFL7
Пасколізумаб		IL-4
Патеклізумаб		LTA
Патритумаб		HER3
Пемтумомаб	Theragyn	MUC1
Перакізумаб		IL17A
Пертузумаб	Omnitarg	HER2/neu
Пекселізумаб		C5
Підилізумаб		PD-1
Пінатузумаб		CD22
Пінтумомаб		антиген аденокарциноми
Плакулумаб		TNF людини
Полатузумаб		CD79B
Понезумаб		людський бета-амілоїд
Приліксимаб		CD4
Притоксаксимаб		шига-токсин E. coli 1 типу
Притумумаб		віментин
PRO 140		CCR5
Хілізумаб		IGHE
Ракотумомаб		N-гліколілнейрамінова кислота
Радретумаб		фібронектину екстрадомен-В
Рафівірумаб		глікопротеїн вірусу сказу
Рамуцирумаб		VEGFR2
Ранібізумаб	Lucentis	VEGF-A
Раксибакумаб		антракс-токсин, захисний антиген
Регавірумаб		цитомегаловірусний глікопротеїн В
Реслізумаб		IL-5
Рилотумумаб		HGF
Ритуксимаб	MabThera, Rituxan	CD20
Робатумумаб		IGF-1-рецептор

Продовження таблиці 1

Роледумаб		RHD
Ромосозумаб		склеросцин
Ронталізумаб		IFN- α
Ровелізумаб	LeukArrest	CD11, CD18
Руплізумаб	Antova	CD154 (CD40L)
Самалізумаб		CD200
Сарилумаб		IL6
Сатумомаб		TAG-72
Сецукінумаб		IL-17A
Серибантумаб		ERBB3
Сетоксаксимаб		шига-токсин E. coli 1 типу
Севірумаб		цитомегаловірус
Сибротузумаб		FAP
Сифалімумаб		IFN- α
Силтуксимаб		IL-6
Симтузумаб		LOXL2
Сиплізумаб		CD2
Сирукумаб		IL-6
Соланезумаб		бета-амілоїд
Солітомаб		ЕрСAM
Сонепцизумаб		сфінгозин-1-фосфат
Сонтузумаб		епісіалін
Стамулумаб		міостатин
Сулесомаб	LeukoScan	NCA-90 (гранулоцитарний антиген)
Сувізумаб		HIV-1
Табалумаб		BAFF
Такатузумаб		альфа-фетобілок
Тадочизумаб		інтегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$
Талізумаб		IgE
Танезумаб		NGF
Таплітумомаб		CD19
Тєфібазумаб	Aurexis	фактор злипання A
Тєлімомаб		невідома
Тєнатумомаб		тенасцин C
Тєнєліксимаб		CD40
Тєплізумаб		CD3
Тєпротумумаб		CD221
TGN1412		CD28
Тицилімумаб (=трємєлімумаб)		CTLA-4
Тигатузумаб		TRAIL-R2
Тилдракізумаб		IL23
TNX-650		IL-13
Торалізумаб		CD154 (CD40L)
Тоситумомаб	Bexxar	CD20
Товєтумаб		CD140a
Тралокінумаб		IL-13
Трастузумаб	Герцептин	HER2/neu
TRBS07	Ektomab	GD2
Трегалізумаб		CD4
Тукотузумаб		ЕрСAM
Тувірумаб		вірус гепатиту B
Ублїтуксимаб		MS4A1
Урєлумаб		4-1BB
Уртоксазумаб		Escherichia coli
Устєкінумаб	Stelara	IL-12, IL-23

Продовження таблиці 1

Вантистумаб		пов'язаний з опіком рецептор
Вапаліксимаб		AOC3 (VAP-1)
Вателізумаб		ITGA2
Ведолізумаб		інтегрин $\alpha_4\beta_7$
Велтузумаб		CD20
Вепалімомаб		AOC3 (VAP-1)
Весенкумаб		NRP1
Візілізумаб	Nuvion	CD3
Волоциксимаб		інтегрин $\alpha_5\beta_1$
Ворсетузумаб		CD70
Вотумумаб	HumaSPECT	пухлинний антиген CTAA16,88
Залутумумаб	HuMax-EGFr	EGFR
Занолімумаб	HuMax-CD4	CD4
Затуксимаб		HER1
Зиралімумаб		CD147 (басигін)
Золімомаб		CD5

На доповнення до описаного вище, антитіло кон'югата лікарський засіб-антитіло за даним винаходом може являти собою Vitaxin, що являє собою гуманізоване антитіло для лікування саркоми; Smart IDIO, що являє собою гуманізоване анти-HLA-DR антитіло для лікування неходжкінської лімфоми; Oncolym, що являє собою мічене радіоактивним ізотопом мишаче анти-HLA-DrlO антитіло для лікування неходжкінської лімфоми; і Allomune, що являє собою гуманізоване анти-CD2 mAb для лікування хвороби Ходжкіна або неходжкінської лімфоми.

Антитіло кон'югата лікарського засобу за даним винаходом також може являти собою будь-який фрагмент антитіла, відомий для лікування будь-якого захворювання, переважно раку. І, в цьому випадку, такі фрагменти антитіла є імуноспецифічними для антигену-мішені і можуть бути одержані комерційно або одержані будь-яким методом, відомим у даній галузі, таким як, наприклад, рекомбінантні методи експресії. Приклади таких доступних антитіл включають кожне з представлених у таблиці нижче.

Таблиця 2

Фрагменти терапевтичного моноклонального антитіла

Тип фрагмента/формат	Торгова назва	Мішень
Fab/химерне	ReoPro (абциксимаб)	GpIIb/gpIIa
Fab/овече	CroFab	Зміїна отрута
Fab/овече	DigiFab	Дигоксин
Fab/овече	Digibind	Дигоксин
Fab/мишаче	CEA-scan (акритумомаб)	CEA
Fab/гуманізоване	Lucentis (панібізумаб; Rhu-Fab)	VEGF
Fab/гуманізоване	Thromboview	D-димер
Fab/ ПЕГильоване гуманізоване	CDP791	VEGF
Fab/ПЕГильоване гуманізоване	CDP870	TNF- α
Fab/біспецифічне гуманізоване	MDX-H210	Her2/Neu & CD64 (γ FcR1)
Одноланцюжковий Fv (scFv)/гуманізоване	Пекселізумаб	комплемент C5
(ScFv) ₄ , злите зі стрептавідином мишаче	CC49	TAG-72 антиген панкарциноми
ScFv, злите з β -лактамазою людське	SGN-17	P97 антиген
ScFv, злите з PEG людське	F5 scFv-PEG Імуноліпосома	Her2

Діатіло (VH-VL) ₂ людське	C6,5K-A	Her2/Neu
Діатіло (VH-VL) ₂ людське	L19 L19-γIFN	EDB домен фібронектину
Діатіло (VL-VH) ₂ людське	T84,66	CEA
Міні-тіло (scFv-CH3) ₂ мишаче-людське химерне (міні-тіло)	T84,66	CEA
Міні-тіло мишаче-людське химерне (міні-тіло)	10H8	Her2
ScFv димер Fc (ScFv) ₂ -Fc мишаче-людське химерне (міні-тіло)	T84,66	CEA
Біспецифічне scFv (VL-VH-VH-VL) мишаче	r28M	CD28 і MAP
Біспецифічне scFv (VL-VH-VH-VL) невідомого походження	BiTE MT103	CD19 і CD3
Біспецифічне scFv (VL-VH-VH-VL) невідомого походження	BiTE	Ep-CAM і CD3
Біспецифічне тандемне діатіло (VH-VL-VH-VL) (мишаче)	Tandab	CD19 і CD3
Vh-β-лактамаза гібридне верблюдяче	Нанотіло	CEA
Dab/людське	Анти-TNFα dAb	TNF-α
Vh/верблюдяче	Нанотіло	TNF-α
Vh/верблюдяче	Нанотіло	фактор фон Віллебранда

(Holliger & Hudson, Nature Biotechnology, 2005, 9, 23).

- У переважних варіантах втілення даного винаходу, антитіло в кон'югатах лікарського засобу за даним винаходом може зв'язуватися з рецептором, кодованим ErbB-геном. Антитіло може специфічно зв'язуватися з ErbB-рецептором, вибраним з EGFR, HER2, HER3 і HER4. Переважно антитіло в кон'югаті лікарського засобу може специфічно зв'язуватися з позаклітинним доменом HER2-рецептора і інгібувати ріст пухлинних клітин, які надекспресують HER2-рецептор. Антитіло кон'югата лікарського засобу може являти собою моноклональне антитіло, наприклад мишаче моноклональне антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло. Переважно гуманізоване антитіло може являти собою huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 або huMAb4D5-8 (Трастузумаб), особливо переважно Трастузумаб. Антитіло також може являти собою фрагмент антитіла, наприклад Fab-фрагмент.

Інші переважні антитіла включають:

- 15 (i) анти-CD4 антитіла; антитіло кон'югата лікарського засобу може являти собою моноклональне антитіло, наприклад мишаче моноклональне антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло;
- (ii) анти-CD5 антитіла; антитіло кон'югата лікарського засобу може являти собою моноклональне антитіло, наприклад мишаче моноклональне антитіло, химерне антитіло або
- 20 гуманізоване антитіло;

(iii) анти-CD13 антитіла; антитіло кон'югата лікарського засобу може являти собою моноклональне антитіло, наприклад мишаче моноклональне антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло; і

(iv) анти-CD20 антитіла; антитіло кон'югата лікарського засобу може являти собою моноклональне антитіло, наприклад мишаче моноклональне антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло, переважно гуманізоване антитіло являє собою Ритуксимаб або фрагмент його антитіла, наприклад Fab-фрагмент.

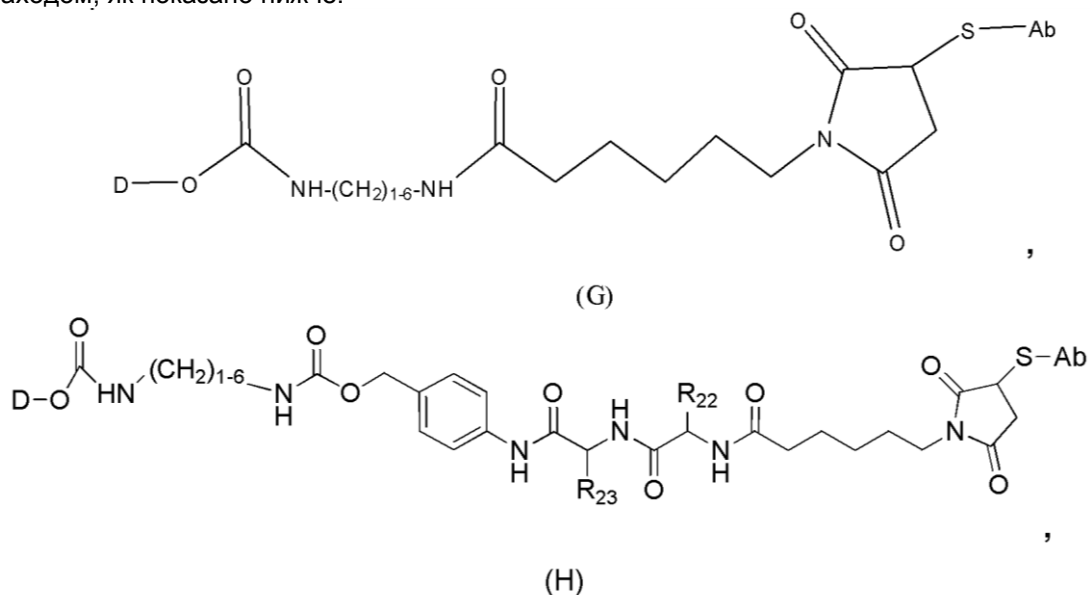
Способи одержання кон'югатів антитіла з лікарським засобом

Кон'югати антитіла з лікарським засобом за даним винаходом можуть бути одержані згідно зі способами, що добре відомі в даній галузі. Способи для кон'югування компонентів, що включають щонайменше один антигензв'язувальний сайт, таких як антитіла, з множиною різних лікарських засобів з використанням різних способів були описані і проілюстровані раніше, наприклад у WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533 і WO-A-2007/024536, зміст яких включений в дану заявку за допомогою посилання. Ці способи включають використання лінкерної групи, яка дериватизує лікарський засіб, токсин або радіонуклід таким чином, щоб його потім можна було приєднати до компонента, такого як антитіло. Приєднання до компонента, такого як антитіло, звичайно здійснюють одним із трьох шляхів: через вільні тиольні групи в цистеїнах після часткового відновлення дисульфідних груп в антитілі, через вільні аміногрупи в лізінах в антитілі і через вільні гідроксильні групи в серинах і/або треонінах в антитілі. Спосіб приєднання варіюється залежно від ділянки приєднання на компоненті, такому як антитіло. Очищення кон'югатів антитіла з лікарським засобом за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC) також було описане [див., наприклад, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Set (USA), 93:8618-8623 (1996), і Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)].

Як відзначалося раніше, корисні навантаження лікарського засобу в кон'югатах лікарського засобу за даним винаходом являють собою дигідропіран-2-онові і тетрагідропіран-2-онові похідні, які були розкриті або які входять в обсяг Міжнародних публікацій №№ WO-A-2007/144423 і WO-A-2009/080761, зміст яких включений в дану заявку за допомогою посилання. Ці сполуки синтезують згідно зі способами, описаними і представленими як приклади в цих міжнародних заявках.

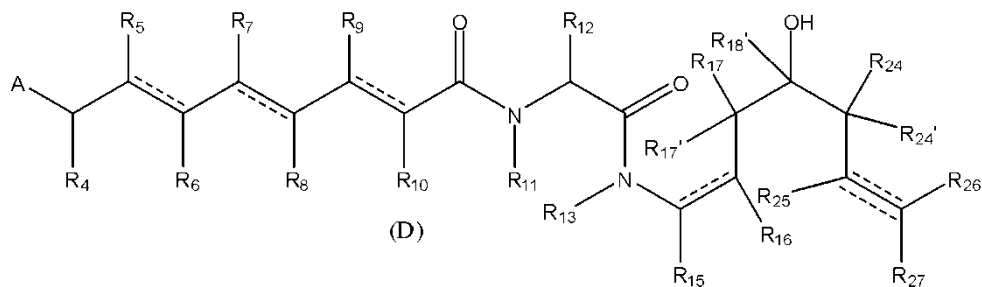
Як відзначалося раніше, у дев'ятому аспекті даного винаходу представлений спосіб одержання кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу, який включає кон'югування компонента Ab, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і лікарського засобу D формули (I), (Ia) або (Ib), де Ab і D мають значення, визначені в першому аспекті даного винаходу.

Один приклад способу одержання кон'югата лікарського засобу за даним винаходом включає одержання кон'югатів антитіла з лікарським засобом формули (G) або (H) за даним винаходом, як показано нижче:

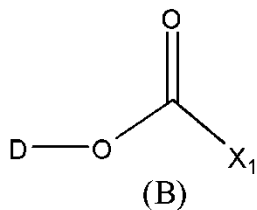


при цьому зазначений спосіб включає наступні стадії:

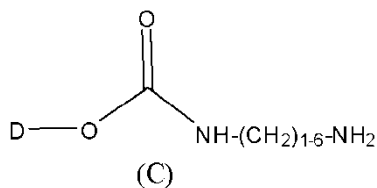
(i) взаємодію лікарського засобу (D) формули (Ia)-H:



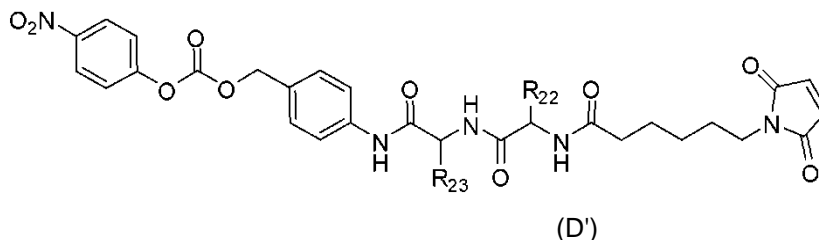
де замісники у визначеннях (Ia) мають значення, визначені вище, зі сполукою формули $X_2-C(O)-X_1$, де X_1 і X_2 являють собою відщеплювані групи, з одержанням сполуки формули (B):



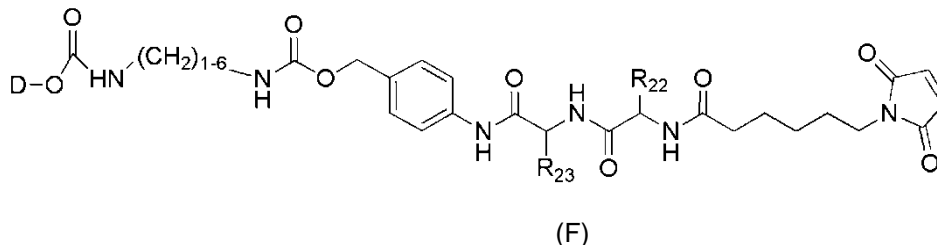
- 5 і точка приєднання групи $-(C=O)X_1$ являє собою вільну гідроксильну групу, приєднану до того ж атома вуглецю, що і R_{18}' ;
 (ii) взаємодію сполуки формули (B), одержаної на стадії (i), з діаміном формули $H_2N-(CH_2)_{1-6}NH_2$ з одержанням сполуки формули (C):



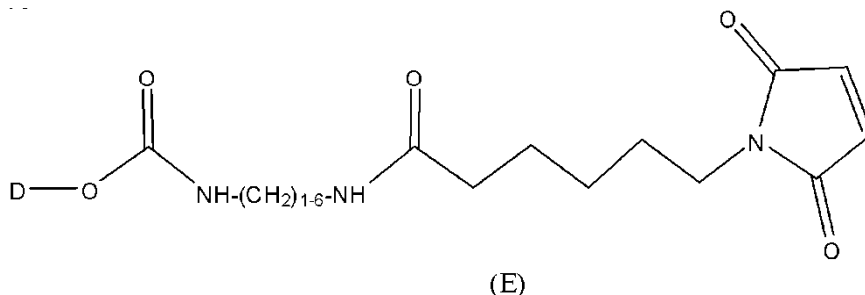
- 10 (iii) або взаємодію сполуки формули (C), одержаної на стадії (ii), зі сполукою формули (D'):



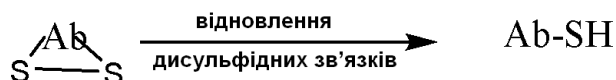
з одержанням сполуки формули (F):



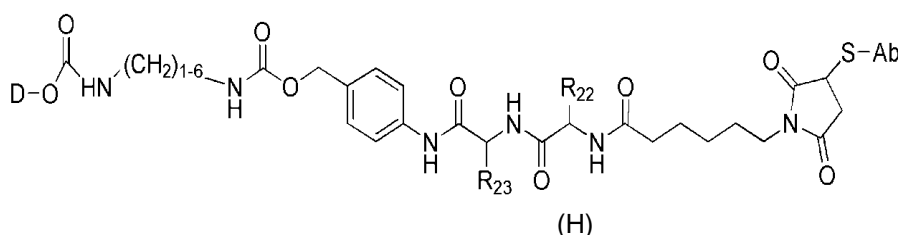
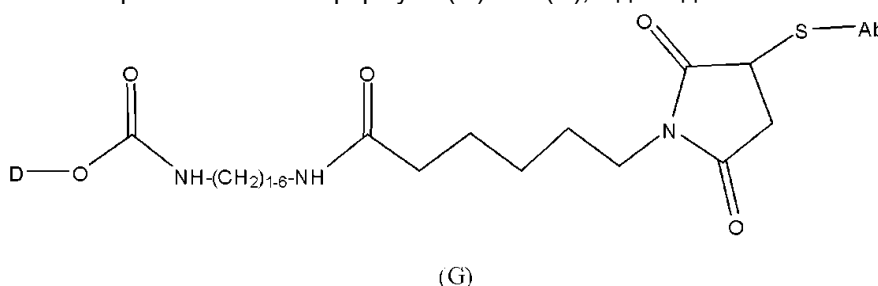
- 15 або взаємодію сполуки (C), одержаної на стадії (ii), з N-гідроксисукцинімідним ефіром 6-малеїмідогексанової кислоти з одержанням сполуки формули (E):



(iv) часткове відновлення одного або декількох дисульфідних зв'язків в антитілі, що повинно бути кон'юговане, з одержанням відновленого антитіла Ab-SH, що містить вільні тіольні групи:



- 5 (v) взаємодію частково відновленого антитіла Ab-SH, що містить вільні тіольні групи, зі сполукою формули (E) або (F), одержаною на стадії (iv), з одержанням цільового кон'югата антитіла з лікарським засобом формули (G) або (H), відповідно:



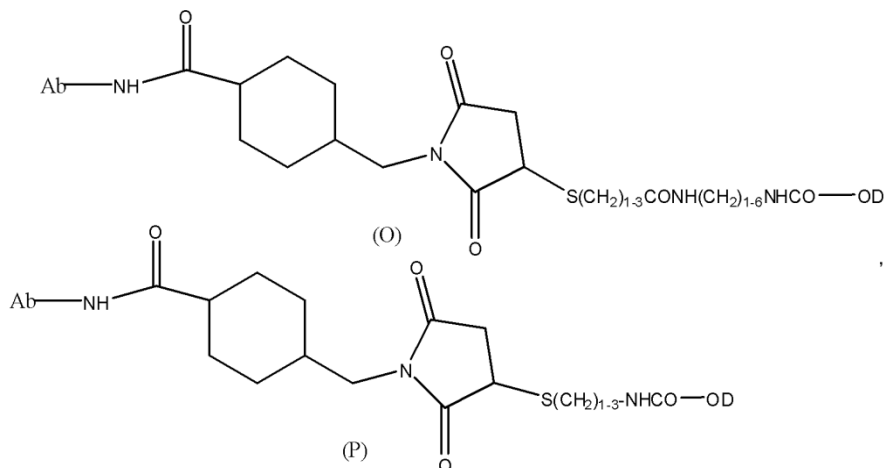
Переважно сполука формули $X_2-C(O)-X_1$, що піддається взаємодії з лікарським засобом (A) на стадії (i), являє собою 1,1'-карбонілдіімідазол.

Переважно діамін на стадії (ii) має формулу $NH_2-(CH_2)_{2-4}-NH_2$, більш переважно він являє собою пропілен-1,3-діамін.

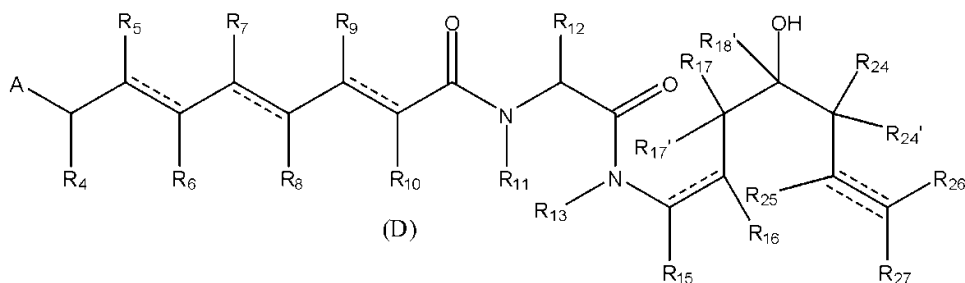
- 15 В одному переважному варіанті втілення даного способу, проміжну сполуку (C) піддають взаємодії зі сполукою формули (D"), де R_{23} являє собою $-(CH_2)_3-NH-CO-NH_2$, і R_{22} являє собою ізопропіл.

- В іншому переважному варіанті втілення цього способу, антитіло вибране з Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, або воно вибране з Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно воно являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину; або воно вибране з анти-CD5 антитіла і анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини, найбільш переважно воно являє собою анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину. Крім того, часткове відновлення цього моноклонального антитіла здійснюють з використанням трис[2-карбоксіетил]фосфінгідрохлориду (TCEP).

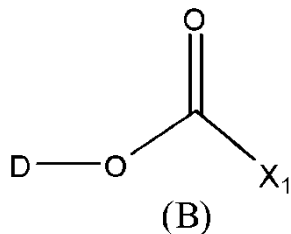
Інший приклад способу одержання кон'югата антитіла з лікарським засобом за даним винаходом включає одержання кон'югатів антитіла з лікарським засобом формули (O) або (P), як показано нижче:



при цьому зазначений спосіб включає наступні стадії:
або (i) взаємодію лікарського засобу (D) формули (Ia)-H:

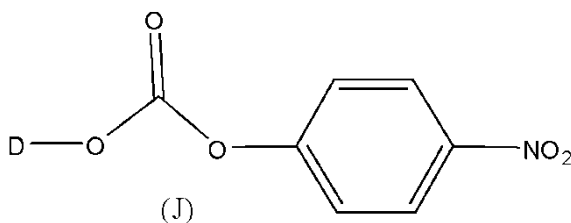


- 5 де замісники у визначеннях (Ia)-H мають значення, визначені вище, зі сполукою формули $X_2-C(O)-X_1$, де X_1 і X_2 являють собою відщеплювані групи, з одержанням сполуки формули (B):



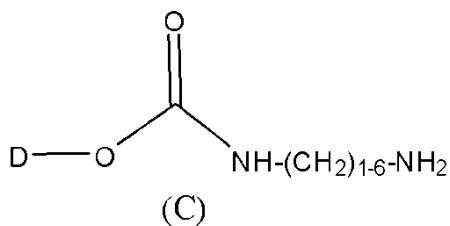
і точка приєднання групи $X_1'(CO)$ являє собою вільну гідроксильну групу, приєднану до того ж атома вуглецю, як R_{18}' , або

- 10 (b) взаємодію зазначеного лікарського засобу (A) формули (Ia)-H, визначеного вище, з 4-нітрофенілхлорформіатом з одержанням сполуки формули (J):

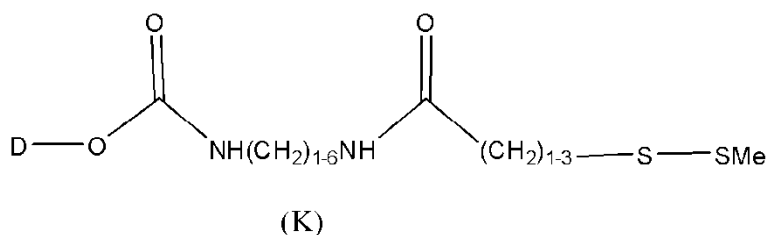


і точка приєднання групи (4-нітрофеніл)-O-CO- являє собою таку ж, як для групи $X_1(CO)$ на стадії (a) вище;

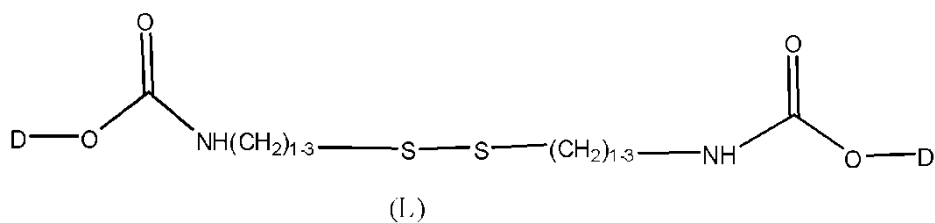
- 15 або (ii)
(c) взаємодію сполуки формули (B), одержаної на стадії (i), з діаміном формули $H_2N-(CH_2)_{1-6}NH_2$ з одержанням сполуки формули (C):



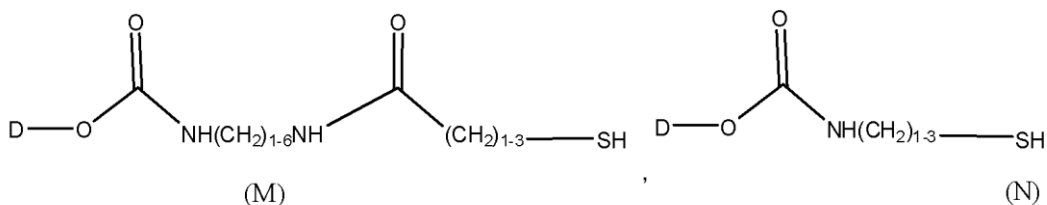
і потім взаємодію одержаної сполуки формули (C) зі сполукою формули $\text{Me-S-S-(CH}_2\text{)}_{1-3}\text{-CO}_2\text{H}$ з одержанням сполуки формули (K)



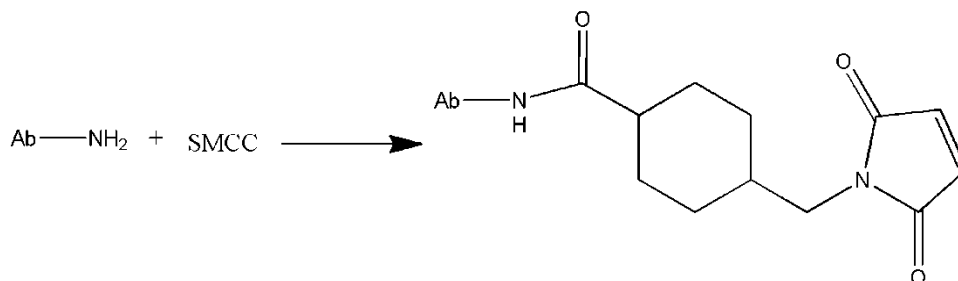
- 5 або
(d) взаємодію сполуки (J), одержаної на стадії (i), з аміноалкілтіосполукою формули $\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_{1-3}\text{SH}$ з одержанням сполуки формули (L):



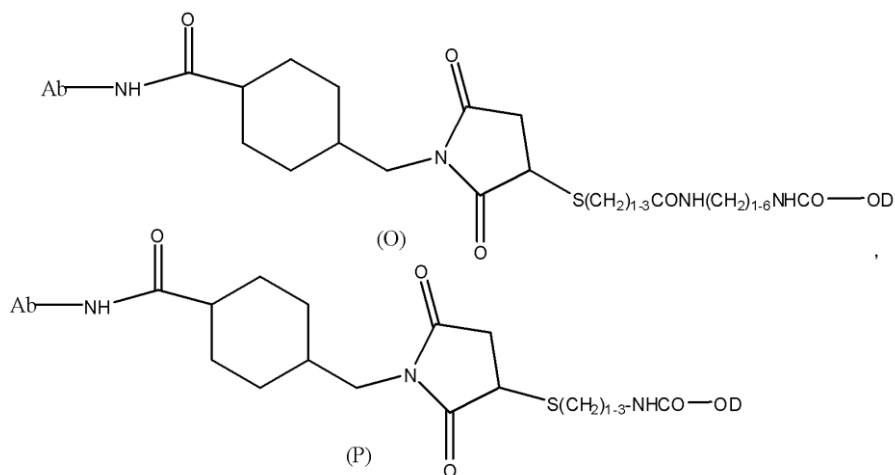
- 10 (iii) взаємодію сполуки формули (K) або (L), одержаної на стадії (ii), з дитіотреїтолом у дисульфідвідновних умовах з одержанням сполук формули (M) і (N), відповідно:



- 15 (iv) взаємодію антитіла, що повинно бути кон'юговане, з сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилатом для дериватизування зазначеного антитіла на одній або декількох лізинових групах сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбонільною групою:



- (v) взаємодію дериватизованого антитіла, одержаного на стадії (iv), або зі сполукою формули (M), або зі сполукою формули (N), одержаною на стадії (iii), з одержанням цільового кон'югата антитіла з лікарським засобом формули (O) або (P):



Що стосується описаного вище способу, сполука формули $\text{X}_2\text{-C(O)-X}_1$ переважно являє собою 1,1'-карбонілдіімідазол. Подібним чином, діамінова сполука формули (B) переважно являє собою $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{2-4}\text{-NH}_2$, більш переважно пропілен-1,3-діамін.

В одному переважному варіанті втілення даного винаходу, сполука, що піддається взаємодії зі сполукою формули (C) для одержання сполуки формули (K), являє собою 3-(метилдисульфаніл)пропанову кислоту.

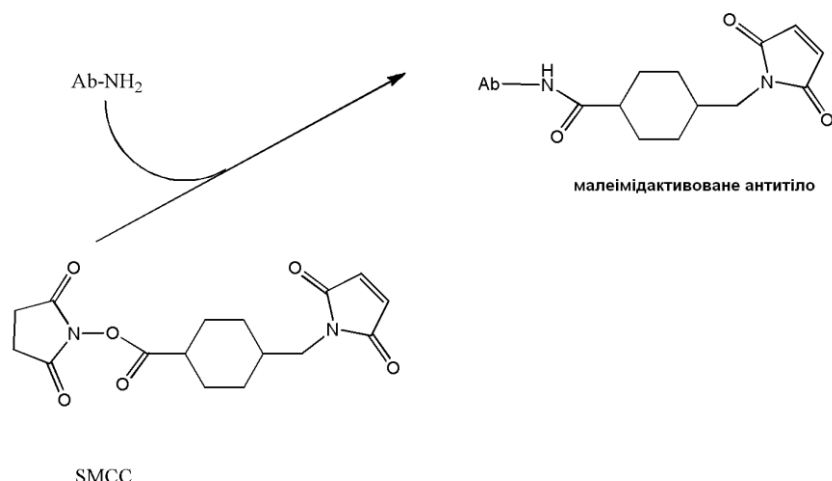
В іншому переважному варіанті втілення даного винаходу, аміноалкілтіосполука, що піддається взаємодії зі сполукою формули (J) для одержання сполуки формули (L), являє собою 3-амінопропан-1-тіол.

Де приєднання до лінкерної групи лікарського засобу здійснюється через вільні тіольні групи в цистеїнах після часткового відновлення дисульфідних груп у компоненті, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, такому як моноклональне антитіло, часткове відновлення звичайно здійснюють спочатку розведенням до придатної концентрації і буферизацією розчину перед частковим відновленням дисульфідних зв'язків шляхом додавання придатного відновника, такого як трис[2-карбоксіетил]фосфінгідрохлорид (TCEP) або дитіотреїтол (DTT). При виборі придатних співвідношень компонента, що підлягає відновленню, такого як моноклональне антитіло, і відновника, умов реакції і часу відновлення, можна одержати потрібне відношення вільного тіолу до компонента, наприклад чотири вільних тіольних групи на моноклональне антитіло.

Частково відновлений компонент, такий як частково відновлене моноклональне антитіло, що містить вільні тіольні групи, одержане, як описано вище, потім піддають взаємодії зі сполуками лікарський засіб-лінкер за даним винаходом (де група L у такій сполуці являє собою малеїмідну групу, що є вільною для взаємодії з тіольними групами). Одержані кон'югати антитіла з лікарським засобом очищають з використанням будь-яких придатних способів, відомих у даній галузі, наприклад за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC) [див., наприклад, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Set (USA), 93:8618-8623 (1996), і Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)].

В одному переважному варіанті втілення даного винаходу моноклональне антитіло являє собою Трастузумаб або анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину; переважно Трастузумаб або його імунологічно активну частину, або переважно анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину.

В альтернативному варіанті втілення даного винаходу, лізини в компоненті, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, такому як моноклональне антитіло, спочатку можна піддати взаємодії із сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилатом. Вільна амінова група на антитілі може взаємодіяти з N-гідроксисукцинімідним складним ефіром з одержанням малеїмідактивованого антитіла:



Малеїмідактивоване антитіло потім піддають взаємодії зі сполукою формули $D-X-(AA)_w-H$, що містить реакційноздатну тіольну групу.

Два конкретних приклади способів одержання кон'югатів антитіла з лікарським засобом формули $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$ за даним винаходом шляхом кон'югування через вільні тіольні групи в цистеїнах після часткового відновлення дисульфідних груп в антитілі і через вільні аміногрупи в лізінах в антитілі з наступною активацією з малеїмідною групою показані на фіг. 1 і 2.

Композиції, що містять кон'югат антитіла з лікарським засобом за даним винаходом, і їх застосування

У п'ятому аспекті даного винаходу представлена фармацевтична композиція, яка включає кон'югат лікарського засобу відповідно до даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій. Приклади форми введення кон'югата лікарського засобу, що має загальну формулу $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$, за даним винаходом включають, без обмеження, пероральну, місцеву, парентеральну, сублінгвальну, ректальну, вагінальну, очну і інтраназальну. Парентеральне введення включає підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, інтратермальні ін'єкції або інфузії. Переважно композиції вводять парентерально. Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути сформульовані таким чином, щоб кон'югат лікарського засобу за даним винаходом був біодоступним при введенні композиції тварині, переважно людині. Композиції можуть приймати форму однієї або декількох одиниць дозування, при цьому, наприклад, таблетка може являти собою одну одиницю дозування, і контейнер для кон'югата антитіла з лікарським засобом за даним винаходом у формі аерозолі може містити множину одиниць дозування.

Фармацевтично прийнятний носій або наповнювач може являти собою речовину у вигляді дрібних частинок, щоб одержувати композиції, наприклад, у формі таблеток або порошку. Носій (носії) може бути рідким, при цьому композиції являють собою, наприклад, пероральний сироп або рідину для ін'єкцій. Крім того, носій (носії) може бути газоподібним, щоб можна було одержати аерозольну композицію, корисну, наприклад, для введення шляхом інгаляції. Термін "носій" стосується розріджувача, ад'юванту або ексципієнта, з яким вводять кон'югат антитіла з лікарським засобом за даним винаходом. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою рідини, такі як вода й масла, включаючи масла нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія і т. п. Носії можуть являти собою фізіологічний розчин, аравійську камедь, желатин, крохмальну пасту, тальк, кератин, колоїдний діоксид кремнію, сечовину і т. п. Крім того, можна використовувати допоміжні речовини, стабілізатори, загусники, мастильні речовини і барвники. В одному варіанті втілення даного винаходу, при введенні тварині, кон'югати антитіла з лікарським засобом за даним винаходом або композиції і фармацевтично прийнятні носії є стерильними. Вода є переважним носієм, коли кон'югати антитіла з лікарським засобом за даним винаходом вводять внутрішньовенно. Фізіологічні розчини і водні розчини декстрази і гліцерин також можна використовувати як рідкі носії, особливо для розчинів для ін'єкцій. Придатні фармацевтичні носії також включають ексципієнти, такі як крохмаль, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, борошно, крейда, силікагель, стеарат натрію, гліцеринмоностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, вода, етанол і т. п. Композиції за даним винаходом, якщо бажано, також можуть містити

незначні кількості змочувальних речовин або емульгаторів, або буферних речовин для регулювання рН.

Коли вона призначена для перорального введення, композиція переважно представлена у твердій або рідкій формі, де напівтверді, напіврідкі, суспендовані і гелеві форми включені в форми, розглянуті в даній заявці або як тверді, або як рідкі.

Як тверда композиція для перорального введення, композиція може бути сформульована у вигляді порошку, гранул, пресованих таблеток, пігулок, капсул, жувальних гумок, пастилок або подібної форми. Така тверда композиція типово містить один або декілька інертних розріджувачів. Крім того, можуть бути присутні одна або декілька з наступних речовин: зв'язуючі, такі як карбоксиметилцелюлоза, етилцелюлоза, мікрористалічна целюлоза або желатин; ексципієнти, такі як крохмаль, лактоза або декстрини; розпушувачі, такі як альгінова кислота, альгінат натрію, кукурудзяний крохмаль і т. п.; мастильні речовини, такі як стеарат магнію; речовини, що забезпечують ковзання, такі як колоїдний діоксид кремнію; підсолоджувачі, такі як сахароза або сахарин; віддушка, така як перцева м'ята, метилсаліцилат або апельсинова віддушка; і барвник.

Коли композиція представлена у формі капсули (наприклад, желатинової капсули), вона містить, на доповнення до речовин зазначеного вище типу, рідкий носій, такий як поліетиленгліколь, циклодекстрин або жирне масло.

Композиція може бути у формі рідини, наприклад еліксиру, сиропу, розчину, емульсії або суспензії. Рідина може бути корисна для перорального введення або для доставки шляхом ін'єкції. Коли вона призначена для перорального введення, композиція може включати один або декілька з підсолоджувачів, консервантів, барвників/забарвлюючих речовин і віддушок. Композиція для введення шляхом ін'єкції також може включати одну або декілька з речовин, таких як поверхнево-активна речовина, консервант, змочувальна речовина, диспергуюча речовина, суспендує речовина, буфер, стабілізатор і ізотонічний агент.

Переважаючий шлях введення являє собою парентеральне введення, включаючи, але не обмежуючись цим, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, внутрішньовенне, підшкірне, інтраназальне, епідуральне, інтрацеребральне, інтравентрикулярне, інтратекальне, інтравагінальне або черезшкірне. Переважаючий шлях введення визначає лікуючий лікар і це буде залежати, почасти, від зони медичного стану (такої як зона раку). У більш переважному варіанті втілення, кон'югати антитіла з лікарським засобом за даним винаходом вводять внутрішньовенно.

Рідкі композиції за даним винаходом, незалежно від того, чи знаходяться вони у формі розчинів, суспензій або у іншій подібній формі, також можуть включати одну або декілька з наступних речовин: стерильні розріджувачі, такі як вода для ін'єкцій, сольовий розчин, переважно фізіологічний сольовий розчин, розчин Рінгера, ізотонічний розчин хлориду натрію, нелеткі масла, такі як синтетичні моно- або дигліцериди, поліетиленгліколи, гліцерин або інші розчинники; антибактеріальні засоби, такі як бензиловий спирт або метилпарабен; і агенти регулювання тоничності, такі як хлорид натрію або декстроза. Парентеральна композиція може бути поміщена в ампулу, одноразовий шприц або багатодозовий флакон зі скла, пластику або іншого матеріалу. Фізіологічний розчин є переважним ад'ювантом.

Кількість кон'югата лікарського засобу за даним винаходом, яка є ефективною для лікування визначеного розладу або стану, буде залежати від природи розладу або стану і її можна визначити стандартними клінічними методами. Крім того, *in vitro* або *in vivo* аналізи можна використовувати для визначення оптимальних діапазонів доз. Точна доза для використання в композиціях також буде залежати від шляху введення і тяжкості захворювання або розладу і її варто визначати відповідно до думки лікуючого лікаря й обставин кожного пацієнта.

Композиції включають ефективну кількість кон'югата лікарського засобу за даним винаходом так, щоб можна було одержати придатну дозу. Придатна доза сполук буде варіюватися відповідно до конкретної композиції, способу застосування і конкретної ділянки її застосування, хазяїна і захворювання, що підлягає лікуванню, наприклад рак, і, у випадку такого захворювання, конкретного типу пухлини. Інші фактори, такі як вік, маса тіла, стать, режим харчування, час введення, швидкість екскреції, стан хазяїна, комбінації лікарських засобів, чутливості реакцій і тяжкість захворювання, потрібно брати до уваги. Введення можна здійснювати безупинно або періодично в межах максимальної переносимої дози.

Типово, ця кількість складає щонайменше близько 0,01 % кон'югата лікарського засобу за даним винаходом в розрахунку на масу композиції. Коли композиція призначена для перорального введення, ця кількість може варіюватися в межах від близько 0,1 % до близько 80 % у розрахунку на масу композиції. Переважні пероральні композиції можуть включати від

близько 4 % до близько 50 % кон'югата лікарського засобу за даним винаходом в розрахунку на масу композиції.

Переважні композиції за даним винаходом одержують таким чином, щоб парентеральна одиниця дозування містила від близько 0,01 % до близько 2 % у розрахунку на масу кон'югата лікарського засобу за даним винаходом.

Для внутрішньовенного введення, композиція може включати типово від близько 0,1 мг/кг до близько 250 мг/кг маси тіла тварини, переважно від близько 0,1 мг/кг до близько 20 мг/кг маси тіла тварини, більш переважно від близько 1 мг/кг до близько 10 мг/кг маси тіла тварини.

Кон'югат лікарського засобу за даним винаходом або композиції можна вводити будь-яким зручним шляхом, наприклад шляхом інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом абсорбції через епітеліальні або шкірно-слизові вистілки.

У конкретних варіантах втілення даного винаходу, може бути бажаним введення одного або декількох кон'югатів лікарського засобу за даним винаходом або композиції локально в область, що потребує лікування. В одному варіанті втілення даного винаходу, введення можна здійснювати шляхом прямої ін'єкції в область (або формуючу область) раку, пухлини або пухлинної або передпухлинної тканини. В іншому варіанті втілення даного винаходу, введення можна здійснювати шляхом прямої ін'єкції в область (або формуючу область) прояву аутоімунного захворювання.

Також можна використовувати внутрішньолегеневе введення, наприклад, з використанням інгалятора або небулайзера і композиції з розпилювальним агентом або через перфузію у фторвуглецевій або синтетичній пульмональній поверхнево-активній речовині. У конкретних варіантах втілення, кон'югат антитіла з лікарським засобом за даним винаходом або композиції можуть бути сформульовані у вигляді супозиторія, з використанням традиційних зв'язуючих і носіїв, таких як тригліцериди.

Композиції за даним винаходом можуть приймати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пігулок, гранул, капсул, капсул, що містять рідини, порошоків, композицій уповільненого вивільнення, супозиторіїв, емульсій, аерозолів, спреїв, суспензій або будь-яку іншу форму, придатну для застосування. Інші приклади придатних фармацевтичних носіїв описані в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

Фармацевтичні композиції можна одержати з використанням методів, добре відомих у фармацевтиці. Наприклад, композицію, призначену для введення шляхом ін'єкції, можна одержати шляхом об'єднання кон'югата лікарського засобу за даним винаходом з водою для одержання розчину. Можна додати поверхнево-активну речовину, яка сприяє утворенню гомогенного розчину або суспензії.

Було виявлено, що кон'югати лікарського засобу і композиції за даним винаходом є особливо ефективними для лікування раку.

Таким чином, як описано вище, шостий аспект даного винаходу забезпечує спосіб лікування пацієнта, який потребує цього, особливо людини, що страждає на рак, який включає введення суб'єкту, що страждає на захворювання, терапевтично ефективної кількості кон'югата лікарського засобу або композиції за даним винаходом. Сьомий аспект даного винаходу забезпечує кон'югат лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу для застосування в лікуванні раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи і лімфоми.

Кон'югати лікарських засобів і композиції за даним винаходом є корисними для інгібування розмноження пухлинної клітини або ракової клітини або для лікування раку у тварини. Кон'югати лікарського засобу і композиції за даним винаходом можна використовувати відповідно в різних умовах для лікування раку тварин. Кон'югати за даним винаходом, що включають лікарський засіб-лінкер-компонент, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, можна використовувати для доставки лікарського засобу або лікарської групи до пухлинної клітини або ракової клітин. Не будучи зв'язаними теорією, в одному варіанті втілення даного винаходу компонент, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, кон'югата лікарського засобу за даним винаходом зв'язується з або вступає в асоціацію з антигеном, асоційованим з раковою клітиною або пухлинною клітиною, і кон'югат лікарського засобу за даним винаходом може захоплюватися усередину пухлинної клітини або ракової клітини через рецептор-опосередкований ендцитоз. Антиген може бути зв'язаний з пухлинною клітиною або раковою клітиною або може являти собою білок позаклітинного матриксу, асоційований з пухлинною клітиною або раковою клітиною. Потрапляючи усередину клітини, одна або декілька специфічних послідовностей у лінкерній групі гідролитично розщеплюються однією або декількома асоційованими з пухлинною клітиною або раковою клітиною протеазами або

гідролазами, приводячи до вивільнення лікарського засобу або сполуки лікарський засіб-лінкер. Вивільнений лікарський засіб або сполука лікарський засіб-лінкер потім є вільними для міграції в клітині й індукції цитотоксичних активностей. В альтернативному варіанті втілення, лікарський засіб або група лікарського засобу відщеплюється від кон'югата лікарського засобу за даним винаходом за межами пухлинної клітини або ракової клітини, і лікарський засіб або сполука лікарський засіб-лінкер потім проникає в клітину.

В одному варіанті втілення даного винаходу, компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, зв'язується з пухлинною клітиною або раковою клітиною. В іншому варіанті втілення даного винаходу, компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, зв'язується з антигеном пухлинної клітини або ракової клітини, що знаходиться на поверхні пухлинної клітини або ракової клітини. Ще в одному варіанті втілення даного винаходу, компонент, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, зв'язується з антигеном пухлинної клітини або ракової клітини, що являє собою білок позаклітинного матриксу, асоційований з пухлинною клітиною або раковою клітиною.

Специфічність компонента, що включає щонайменше один антигензв'язувальний сайт, відносно визначеної пухлинної клітини або ракової клітини може бути важливою для визначення тих типів пухлин або раку, які найбільш ефективно лікуються. Наприклад, кон'югати лікарського засобу за даним винаходом, що містять групу Трастузумабу (Herapin®), можуть бути корисними для лікування антигенпозитивних карцином, включаючи лейкози, рак легень, рак товстої кишки, лімфоми (наприклад, хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома), солідні пухлини, такі як саркома і карциноми, множинну мієлому, рак нирки і меланому. Рак переважно може являти собою рак легень, колоректальний рак, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак нирки, лейкоз, множинну мієлому, лімфому або рак яєчника. Наприклад, кон'югати лікарського засобу за даним винаходом, що містять групу Ритуксимабу, можуть бути корисними для лікування CD20-експресуючих пухлин, таких як гематологічні типи раку, включаючи лейкози і лімфоми. Наприклад, кон'югати лікарського засобу за даним винаходом, що містять групу анти-CD4 антитіла, можуть бути корисними для лікування CD4-експресуючих пухлин, таких як гематологічні типи раку, включаючи лімфоми. Наприклад, кон'югати лікарського засобу за даним винаходом, що містять групу анти-CD5 антитіла, можуть бути корисними для лікування CD5-експресуючих пухлин, таких як гематологічні типи раку, включаючи лейкози і лімфоми. Наприклад, кон'югати лікарського засобу за даним винаходом, що містять групу анти-CD13 антитіла, можуть бути корисними для лікування CD13-експресуючих пухлин, таких як гематологічні типи раку, включаючи лейкози і лімфоми.

Інші конкретні типи раку, які можна лікувати за допомогою кон'югатів лікарського засобу за даним винаходом, включають, але не обмежуються цим: гематологічні типи раку, включаючи усі форми лейкозу; лімфоми, такі як хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома, і множинна мієлома.

Зокрема, кон'югати лікарського засобу і композиції за даним винаходом демонструють чудову активність для лікування раку, такого як рак легень, колоректальний рак, рак молочної залози, рак підшлункової залози, рак нирки, лейкоз, множинна мієлома, лімфома і рак яєчника.

Кон'югати лікарського засобу і композиції за даним винаходом забезпечують кон'югація-специфічне таргетування пухлини або раку, таким чином знижуючи загальну токсичність цих кон'югатів. Лінкерні групи стабілізують кон'югати лікарський засіб-антитіло в крові, при цьому розщеплюються пухлиноспецифічними протеазами і гідролазами усередині клітини, вивільняючи лікарський засіб.

Кон'югати лікарських засобів і композиції за даним винаходом можна вводити тварині, яка також піддавалася хірургічній операції для лікування раку. В одному варіанті втілення даного винаходу, додатковий спосіб лікування являє собою променеву терапію.

У спеціальному варіанті здійснення даного винаходу, кон'югат лікарського засобу або композицію за даним винаходом вводять одночасно з хіміотерапевтичним засобом або з променевою терапією. В іншому спеціальному варіанті здійснення даного винаходу, хіміотерапевтичний засіб або променеву терапію вводять до або після введення кон'югата лікарського засобу або композиції за даним винаходом, переважно щонайменше з проміжком часу одна година, п'ять годин, 12 годин, один день, один тиждень, один місяць, більш переважно декілька місяців (наприклад, до трьох місяців), до або після введення кон'югата антитіла з лікарським засобом або композиції за даним винаходом.

Хіміотерапевтичний засіб можна вводити протягом ряду сеансів лікування, можна вводити будь-який один або комбінацію хіміотерапевтичних засобів, відомих у даній галузі.

Що стосується опромінення, можна використовувати будь-який протокол променевої терапії, залежно від типу раку, що підлягає лікуванню. Наприклад, але не як обмеження, можна

застосовувати рентгенівське опромінення; зокрема, можна використовувати високопотужне мегавольтне опромінення (опромінення потужністю більше ніж 1 MeV) для глибоких пухлин, і електронно-променеве й ортовольтажне рентгенівське випромінювання можна використовувати для раку шкіри. Також можна вводити випромінюючі гамма-промені радіоізотопи, такі як

5 радіоактивні ізотопи радію, кобальту й інших елементів.

У восьмому аспекті даного винаходу представлений набір, який включає терапевтично ефективну кількість кон'югата лікарського засобу відповідно до першого аспекту даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій.

10 В одному варіанті втілення даного винаходу, набір відповідно до цього аспекту призначений для використання в лікуванні раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчника.

Короткий опис креслень

15 Винахід схематично проілюстрований, за допомогою прикладу, на прикладених кресленнях, де:

фіг. 1 являє собою схематичну ілюстрацію одного способу відповідно до даного винаходу, де кон'югація з антитілом здійснюється через вільні тіольні групи;

фіг. 2 являє собою схематичну ілюстрацію іншого способу відповідно до даного винаходу, де кон'югація з антитілом здійснюється через вільні лізинні групи;

20 фіг. 3 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC1 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 4 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC1 при 10 або 1 мкг/мл;

25 фіг. 5 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC2 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 6 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC2 при 10 або 1 мкг/мл;

фіг. 7 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC3 проти різних ракових клітинних ліній;

30 фіг. 8 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC3 при 10 або 1 мкг/мл;

фіг. 9 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC4 проти різних ракових клітинних ліній;

35 фіг. 10 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC4 при 10 або 1 мкг/мл;

фіг. 11 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC5 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 12 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC5 при 10 або 1 мкг/мл;

40 фіг. 13 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC6 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 14 представляє гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC6 при 10 або 1 мкг/мл;

45 фіг. 15 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC7 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 16 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC7 при 50 або 1 мкг/мл;

фіг. 17 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC8 проти різних ракових клітинних ліній;

50 фіг. 18 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC8 при 50 або 10 мкг/мл;

фіг. 19 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC9 проти різних ракових клітинних ліній;

55 фіг. 20 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC9 при 50 або 0,1 мкг/мл;

фіг. 21 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC10 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 22 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC10 при 50 або 1 мкг/мл;

фіг. 23 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC11 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 24 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC11 при 50 або 1 мкг/мл;

5 фіг. 25 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC12 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 26 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC12 при 1 або 0,1 мкг/мл;

10 фіг. 27 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC13 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 28 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC13 при 1 або 0,1 мкг/мл;

фіг. 29 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC14 проти різних ракових клітинних ліній;

15 фіг. 30 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC14 при 1 мкг/мл;

фіг. 31 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC16 проти різних ракових клітинних ліній;

20 фіг. 32 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC16 при 1 або 0,1 мкг/мл;

фіг. 33 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC17 проти різних ракових клітинних ліній;

фіг. 34 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC17 при 1 і 0,1 мкг/мл;

25 фіг. 35 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC14 проти двох Raji клітинних клонів;

фіг. 36 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC14 при 10 мкг/мл;

30 фіг. 37 представляє репрезентативні криві доза-відповідь для ADC15 проти двох Raji клітинних клонів; і

фіг. 38 представляє гістограми, що показують відсоток клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC15 при 10 мкг/мл.

Приклади

35 Даний винахід далі проілюстрований за допомогою наступних, необмежувальних прикладів. У прикладах використані наступні аббревіатури:

CDI-1,1'-карбонілдіімідазол,

DIPEA - діізопропілетиламін,

Hex - гексан,

EtOAc - етилацетат,

40 DCM - дихлорметан,

NMP-N-метил-2-піролідон,

DMF - диметилформамід,

EDC-N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімідгідрохлорид

EDTA - етилендіамінтетраоцтова кислота,

45 MeOH - метанол,

DTT - дитіотреїтол,

Py - піридин,

THF - тетрагідрофуран,

TCEP - трис[2-карбоксіетил]фосфінгідрохлорид,

50 MC-6-малеїмідокапроїл,

Fmoc-9-флуоренілметоксикарбоніл,

Cit - цитрулін,

Val - валін,

DMSO - диметилсульфоксид,

55 Trt - трифенілметил,

HOBT-1-гідроксибензотриазол,

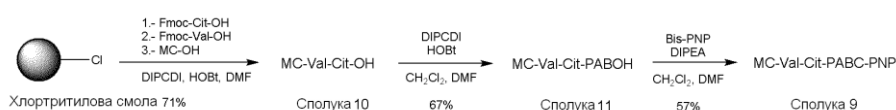
DIPCDI-N, N'-діізопропілкарбодіімід,

TFA - трифтороцтова кислота,

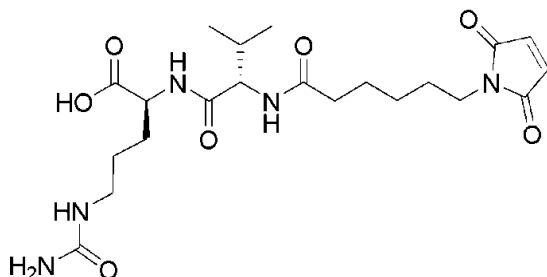
PABOH-4-амінобензиловий спирт,

60 bis-PNP - біс(4-нітрофеніл)карбонат,

NAC-N-ацетилцистеїн,
 SEC - ексклюзійна хроматографія,
 ВЕРХ - вискоєфективна рідинна хроматографія,
 ADC - кон'югат антитіла з лікарським засобом,
 ATCC - Американська колекція типових культур,
 DMEM - модифіковане по способу Дульбекко середовище Ігла,
 RPMI - живильне середовище Rossmell Park Memorial Institute,
 ITS - доповнює середовище інсулін-трансферин-натрійселеніт,
 FCS - фетальна теляча сироватка,
 SRB - сульфородамін В,
 PBS - фосфатно-сольовий буферний розчин,
 DR - доза-відповідь,
 UV - ультрафіолет,
 SMCC - сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат,
 LAR - відношення лінкера до антитіла,
 Приклад одержання
 Одержання Сполуки 9: MC-Val-Cit-PABC-PNP
 Схема реакції



(а) Одержання Сполуки 10: MC-Val-Cit-OH
 Сполука 10



Cl-TrtCl-смоли (20 г, 1,49 ммоль/г) (Iris Biotech, Ref.: BR-1065, 2-хлортритилхлоридну смоли (200-400 меш, 1 % DVB, 1,0-1,6 ммоль/г), CAS 42074-68-0) поміщали на фільтрувальну пластину. До смоли додавали 100 мл DCM і суміш перемішували протягом 1 години. Розчинник відганяли за допомогою фільтрації у вакуумі. Додавали розчин Fmoc-Cit-OH (11,83 г, 29,78 ммоль) і DIPEA (17,15 мл, 98,45 ммоль) у DCM (80 мл) і суміш перемішували протягом 10 хвилин. Після цього додавали DIPEA (34,82 мл, 199,98 ммоль) і суміш перемішували протягом 1 години. Реакцію зупиняли шляхом додавання MeOH (30 мл) після перемішування протягом 15 хвилин. Одержану в результаті Fmoc-Cit-O-TrtCl-смоли піддавали наступним промиванням/обробкам: DCM (5×50 мл × 0,5 хв.), DMF (5×50 мл × 0,5 хв.), піперидин:DMF (1:4, 1×1 хв., 2×10 хв.), DMF (5×50 мл × 0,5 хв.), DCM (5×50 мл × 0,5 хв.), кінцеве піперидинове промивання привело до одержання NH₂-Cit-O-TrtCl-смоли. Завантаження було розраховано: 1,15 ммоль/г.

Одержану вище NH₂-Cit-O-TrtCl-смоли промивали за допомогою DMF (5×50 мл × 0,5 хв.) і додавали розчин Fmoc-Val-OH (31,22 г, 91,98 ммоль), HOBT (11,23 г, 91,98 ммоль) у DMF (100 мл) до NH₂-Cit-O-TrtCl-смоли, перемішували і додавали DIPCdI (14,24 мл, 91,98 ммоль) і суміш перемішували протягом 1,5 години. Реакцію зупиняли шляхом промивання за допомогою DMF (5×50 мл × 0,5 хв.). Одержану таким чином Fmoc-Val-Cit-O-TrtCl-смоли обробляли сумішшю піперидин:DMF (1:4, 1×1 хв., 2 × 10 хв.) і промивали за допомогою DMF (5×50 мл × 0,5 хв.), кінцеве піперидинове промивання привело до одержання NH₂-Val-Cit-O-TrtCl-смоли.

Розчин 6-малеїмідокапронової кислоти (MC-OH) (9,7 г, 45,92 ммоль), HOBT (6,21 г, 45,92 ммоль) у DMF (100 мл) додавали до одержаної вище NH₂-Val-Cit-O-TrtCl-смоли, перемішували і додавали DIPCdI (7,12 мл, 45,92 ммоль) і суміш перемішували протягом 1,5 години. Реакцію зупиняли шляхом промивання за допомогою DMF (5×50 мл × 0,5 хв.) і DCM (5×50 мл × 0,5 хв.).

Пептид відщеплювали від смоли шляхом обробки сумішшю TFA:DCM (1:99, 5×100 мл). Смоли промивали за допомогою DCM (7×50 мл × 0,5 хв.). Об'єднані фільтрати упарювали

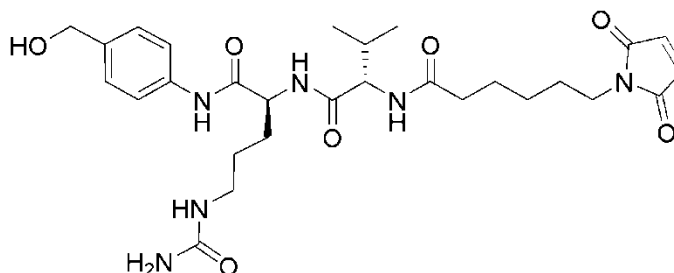
досуха при зниженому тиску й одержану тверду речовину розтирали в порошок з Et₂O і фільтрували з одержанням Сполуки 10 (7,60 г, 71 %) у вигляді білої твердої речовини.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,47 (с, 1H), 8,13 (д, J=7,3 Гц, 1H), 7,74 (д, J=9,0 Гц, 1H), 6,99 (с, 2H), 5,93 (с, 1H), 5,35 (с, 2H), 4,20 (дд, J=9,0, 6,8 Гц, 1H), 4,15-4,07 (м, 1H), 3,36 (т, J=7,0 Гц, 2H), 3,00-2,88 (м, 2H), 2,21-2,12 (м, 1H), 2,11-2,03 (м, 1H), 1,98-1,86 (м, 1H), 1,74-1,62 (м, 1H), 1,61-1,50 (м, 1H), 1,50-1,31 (м, 6H), 1,21-1,11 (м, 2H), 0,84 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,80 (д, J=6,8 Гц, 3H).

ESI-MS m/z: розраховано для C₂₁H₃₃N₅O₇: 467,2; знайдено: 468,3 (M+H)⁺.

(b) Одержання Сполуки 11: MC-Val-Cit-PABOH

Сполука 11



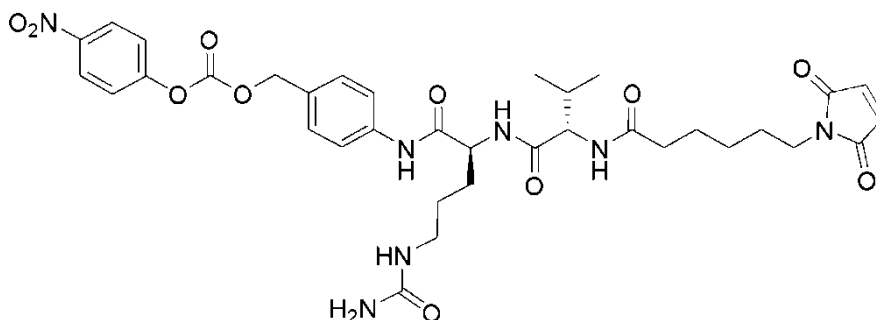
До розчину Сполуки 10 (1,6 г, 3,42 ммоль) і 4-амінобензилового спирту (PABOH) (0,84 г, 6,84 ммоль) у DCM (60 мл) додавали розчин HOBT (0,92 г, 6,84 ммоль) у DMF (5 мл). Додавали DIPCDI (1,05 мл, 6,84 ммоль), реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при 23 °С, додавали Et₂O (150 мл) і одержану тверду речовину фільтрували у фільтрувальній пластині під вакуумом з одержанням Сполуки 11 (1,31 г, 67 %).

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 9,88 (с, 1H), 8,03 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,77 (дд, J=12,2, 8,5 Гц, 1H), 7,53 (д, J=8,2 Гц, 2H), 7,21 (д, J=8,2 Гц, 2H), 6,99 (с, 3H), 6,01-5,92 (м, 1H), 5,39 (с, 2H), 5,07 (с, 1H), 4,41 (с, 2H), 4,39-4,31 (м, 1H), 4,23-4,12 (м, 1H), 3,36 (т, J=7,0 Гц, 2H), 3,06-2,97 (м, 1H), 2,96-2,90 (м, 1H), 2,22-2,03 (м, 2H), 2,01-1,88 (м, 1H), 1,76-1,62 (м, 1H), 1,63-1,28 (м, 6H), 1,25-1,11 (м, 2H), 0,84 (д, J=6,9 Гц, 3H), 0,81 (д, J=6,8 Гц, 3H).

ESI-MS m/z: розраховано для C₂₈H₄₀N₆O₇: 572,3; знайдено: 573,3 (M+H)⁺.

(с) Одержання Сполуки 9: MC-Val-Cit-PAB-PNP

Сполука 9



До розчину Сполуки 11 (500 мг, 0,87 ммоль) і біс(4-нітрофеніл)карбонату (bis-PNP) (2,64 г, 8,72 ммоль) у суміші DCM:DMF (8:2, 25 мл) додавали DIPEA (0,45 мл, 2,61 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 20 годин при 23°C і вносили в колонку з силікагелем (DCM:CH₃OH, від 50:1 до 10:1) з одержанням чистої цільової Сполуки 9 (364 мг, 57 %).

R_f=0,40 (CH₂Cl₂:CH₃OH, 9:1).

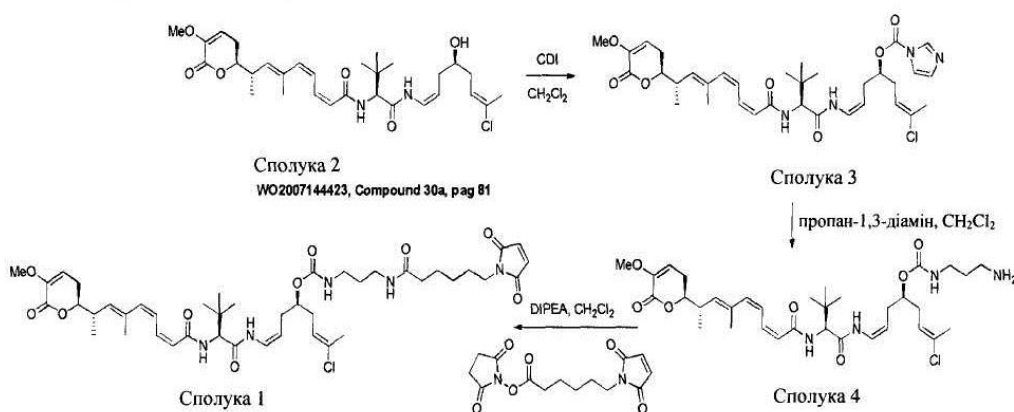
¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃/CD₃OD): δ 9,45 (с, 1H), 8,23 (д, J=8,3 Гц, 2H), 7,59 (д, J=8,5 Гц, 2H), 7,35 (д, J=8,3 Гц, 2H), 7,34 (д, J=8,5 Гц, 2H), 6,65 (с, 2H), 5,20 (с, 2H), 4,56 (дт, J=10,5, 5,4 Гц, 1H), 4,15 (д, J=7,2 Гц, 1H), 3,46 (дд, J=8,0, 6,4 Гц, 2H), 3,16-2,89 (м, 2H), 2,21 (дд, J=8,3, 6,6 Гц, 2H), 2,06-1,97 (м, 1H), 1,90-1,83 (м, 1H), 1,73-1,46 (м, 7H), 1,34-1,20 (м, 2H), 0,91 (д, J=6,7 Гц, 3H), 0,90 (д, J=6,7 Гц, 3H).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃/CD₃OD) δ 174,4, 172,4, 171,1, 170,6, 160,5, 155,5, 152,5, 145,3, 138,7, 134,1, 129,9, 129,5, 125,2, 121,8, 120,0, 70,6, 59,0, 53,2, 37,5, 35,8, 30,6, 29,6, 29,3, 28,1, 26,2, 26,2, 25,1, 19,1, 18,1.

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₅H₄₃N₇O₁₁: 737,3; знайдено: 738,3 (M+H)⁺.

Приклад 1

Одержання Сполуки 1



(а) Одержання Сполуки 3

До розчину Сполуки 2 (Сполука 30а, одержана, як описано в WO 2007144423, зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання) (1,014 г, 1,8 ммоль) у DCM (45 мл) додавали 1,1'-карбонілдіімідазол (876 мг, 5,4 ммоль). Після перемішування при 23°C протягом ночі реакційну суміш концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Нех:ЕtОAc, від 99:1 до 85:15) з одержанням чистої Сполуки 3 (1,176 г, 86 %).

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,39 (д, J=9,0 Гц, 1H), 8,12 (шир.с, 1H), 7,40 (шир.с, 1H), 7,30 (т, J=11,5 Гц, 1H), 7,08 (шир.с, 1H), 6,91 (т, J=12,0 Гц, 1H), 6,86 (т, J=10,0 Гц, 1H), 6,22 (д, J=9,0 Гц, 1H), 6,18 (д, J=11,0 Гц, 1H), 5,67 (д, J=12,0 Гц, 1H), 5,63-5,61 (м, 2H), 5,28 (д, J=11,5 Гц, 1H), 4,94-4,91 (м, 1H), 4,81-4,76 (м, 1H), 4,42 (д, J=9,0 Гц, 1H), 4,23-4,19 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 2,87-2,82 (м, 1H), 2,58-2,46 (м, 3H), 2,42-2,35 (м, 3H), 2,08 (с, 3H), 1,83 (с, 3H), 1,16 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,06 (с, 9H).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 168,5, 166,4, 161,5, 148,7, 145,2, 140,4, 137,6, 137,0, 134,4, 133,9, 133,0, 130,9, 124,2, 123,9, 121,0, 120,5, 117,03, 110,0, 108,1, 104,1, 81,7, 77,8, 60,4, 55,4, 37,2, 34,5, 26,6, 26,3, 21,0, 17,1, 16,6.

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₄₅ClN₄O₇: 656,30; знайдено: 657,3 (M+H)⁺.

(b) Одержання Сполуки 4

До розчину Сполуки 3 (1,160 мг, 1,78 ммоль) у DCM (45 мл), одержаної, як описано на стадії (а) вище, додавали пропан-1,3-діамін (0,19 мл, 2,22 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі і потім концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiNH₂, DCM:CH₃OH, від 100:0 до 97:3) з одержанням чистої Сполуки 4 (800 мг, 68 %).

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,90 (д, J=11,7 Гц, 1H), 7,34-7,26 (м, 1H), 6,99-6,74 (м, 2H), 6,50 (д, J=9,0 Гц, 1H), 6,15 (д, J=12,9 Гц, 1H), 5,83 (т, J=11,5 Гц, 1H), 5,70 (д, J=11,5 Гц, 1H), 5,68-5,57 (м, 2H), 5,27 (д, J=9,4 Гц, 1H), 4,80 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,52-4,44 (м, 2H), 4,24-4,17 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,39-3,17 (м, 2H), 2,93-2,82 (м, 1H), 2,78 (т, J=6,5 Гц, 2H), 2,50-2,34 (м, 2H), 2,34-2,24 (м, 2H), 2,19-1,99 (м, 2H), 2,06 (с, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,72-1,50 (м, 2H), 1,16 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,04 (с, 9H).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 168,4, 166,1, 161,5, 156,7, 145,2, 139,9, 137,1, 134,0, 133,9, 131,8, 124,3, 124,2, 122,5, 120,9, 108,1, 105,5, 81,8, 74,3, 60,6, 55,4, 39,81, 39,30 37,2, 34,7, 33,1, 31,5, 29,6, 26,7, 26,2, 21,0, 17,1, 16,6.

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₅₁ClN₄O₇: 662,30; знайдено: 663,3 (M+H)⁺.

(c) Одержання Сполуки 1

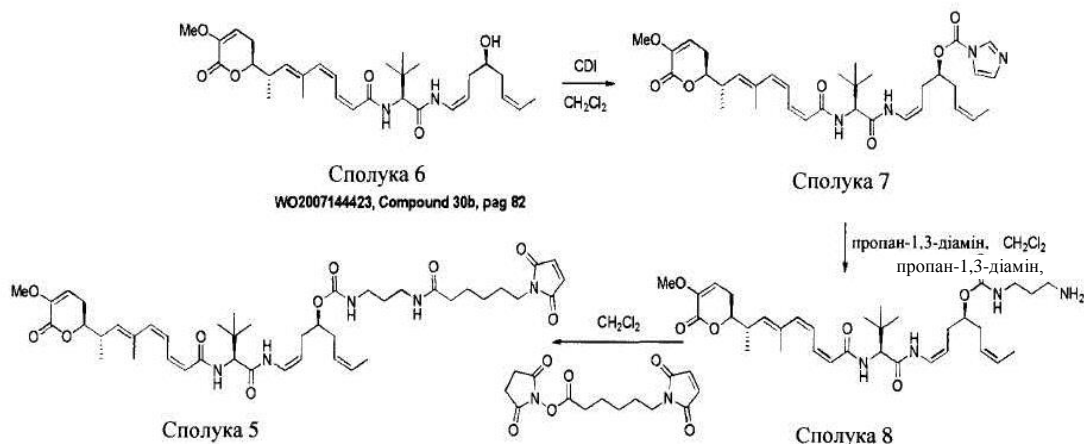
До розчину Сполуки 4 (52 мг, 0,078 ммоль), одержаної, як описано на стадії (b) вище, і N-гідроксисукцинімідного ефіру 6-малеїмідогексанової кислоти (27,1 мг, 0,088 ммоль) у DCM (2 мл) додавали DIPEA (15 мкл, 0,086 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Нех:ЕtОAc) з одержанням чистої цільової Сполуки 1 (29,7 мг, 44 %).

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,86 (д, J=10,8 Гц, 1H), 7,30 (т, J=11,6 Гц, 1H), 6,90 (тд, J=11,5, 1,2 Гц, 1H), 6,78 (т, J=9,7 Гц, 1H), 6,68 (шир.с, 2H), 6,63 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,51 (т, J=6,4 Гц, 1H), 6,16 (д, J=11,8 Гц, 1H), 5,76 (т, J=6,4 Гц, 1H), 5,72 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,65 (дд, J=6,4, 2,9 Гц, 1H), 5,62-5,57 (м, 1H), 5,29 (д, J=11,1 Гц, 1H), 4,81 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,52-4,48 (м, 2H), 4,24 (ддд, J=11,4, 7,3, 4,3 Гц, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,50 (т, J=7,3 Гц, 2H), 3,33-3,10 (м, 4H), 2,93-2,81 (м, 1H), 2,45-2,31 (м, 5H), 2,17 (т, J=7,6 Гц, 2H), 2,10-1,98 (м, 1H), 2,07 (с, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,72-1,54 (м, 8H), 1,16 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 173,8, 170,8, 168,3, 166,5, 161,6, 157,1, 145,1, 140,4, 137,5, 134,2, 134,1, 134,0, 131,9, 124,2, 124,0, 122,5, 120,6, 108,3, 106,0, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 37,7, 37,6, 37,2, 36,3, 36,1, 34,7, 33,4, 31,0, 29,8, 28,3, 26,7, 26,3, 26,2, 25,6, 21,0, 17,2, 16,6.

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{ClN}_5\text{O}_{10}$: 855,42; знайдено: 856,5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5 Приклад 2 Одержання Сполуки 5



(а) Одержання Сполуки 7

До розчину Сполуки 6 (Сполука 30b, одержана, як описано в WO 2007144423, зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання) (750 мг, 1,42 ммоль) у DCM (35,5 мл) додавали 1,1'-карбонілдіімідазол (691 мг, 4,26 ммоль). Після перемішування при 23°C протягом ночі реакційну суміш концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс) з одержанням чистої Сполуки 7 (717 мг, 81 %).

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8,24 (д, $J=11,0$ Гц, 1H), 8,09 (с, 1H), 7,40 (с, 1H), 7,36-7,23 (м, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,95-6,83 (м, 2H), 6,34 (д, $J=9,2$ Гц, 1H), 6,14 (д, $J=11,8$ Гц, 1H), 5,74-5,57 (м, 3H), 5,43-5,34 (м, 1H), 5,28 (д, $J=10,2$ Гц, 1H), 4,98-4,88 (м, 1H), 4,78 (кв., $J=7,8$ Гц, 1H), 4,47 (д, $J=9,2$ Гц, 1H), 4,25-4,16 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 2,92-2,76 (м, 1H), 2,59-2,37 (м, 6H), 1,83 (с, 3H), 1,64 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,14 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,03 (с, 9H).

(b) Одержання Сполуки 8

До розчину Сполуки 7 (1,68 г, 2,7 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у DCM (80 мл) додавали пропан-1,3-діамін (0,27 мл, 3,24 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , DCM: CH_3OH , від 100:0 до 97:3) з одержанням Сполуки 8 (854 мг, 50 %).

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8,90 (д, $J=11,7$ Гц, 1H), 7,39-7,18 (м, 1H), 6,92-6,84 (м, 2H), 6,50 (д, $J=9,0$ Гц, 1H), 6,15 (д, $J=12,9$ Гц, 1H), 5,75-5,67 (м, 2H), 5,66-5,54 (м, 2H), 5,46-5,33 (м, 1H), 5,26 (д, $J=10,3$ Гц, 1H), 4,83 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,50-4,48 (м, 2H), 4,30-4,04 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,39-3,17 (м, 2H), 2,93-2,82 (м, 1H), 2,78 (т, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,50-2,34 (м, 3H), 2,34-2,24 (м, 2H), 2,19-1,99 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,72-1,50 (м, 2H), 1,62 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,16 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 1,04 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 168,3, 166,2, 161,6, 157,1, 145,1, 139,9, 137,1, 134,0, 133,9, 126,9, 124,9, 124,2, 123,9, 120,9, 108,2, 106,3, 81,8, 75,0, 60,6, 55,4, 39,6, 37,2, 34,7, 32,8, 31,5, 31,1, 29,6, 26,7, 26,2, 17,1, 16,6, 12,9.

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_7$: 628,4; знайдено: 629,5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(с) Одержання Сполуки 5

До розчину Сполуки 8 (150 мг, 0,24 ммоль), одержаної, як описано на стадії (b) вище, у DCM (8 мл) при 23°C додавали N -гідроксисукцинімідний ефір 6-малеїмідогексанової кислоти (88,3 мг, 0,28 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 18 годин і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс) з одержанням чистої цільової Сполуки 5 (75 мг, 38 %).

^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,87 (д, $J=10,7$ Гц, 1H), 7,32-7,22 (м, 1H), 6,89 (т, $J=11,6$ Гц, 1H), 6,78 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 6,68 (с, 2H), 6,61 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,54 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 6,15 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 5,77-5,51 (м, 2H), 5,64 (дд, $J=6,4$, 3,0 Гц, 1H), 5,60-5,55 (м, 1H), 5,38 (ддд, $J=13,0$, 8,8, 6,6 Гц, 1H), 5,28 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 4,83 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,59-4,44 (м, 2H), 4,23 (ддд, $J=11,5$, 7,2, 4,4 Гц, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,49 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,29-3,12 (м, 4H), 2,87-2,81 (м, 1H), 2,48-2,32 (м, 5H),

2,18-2,09 (м, 3H), 1,88-1,82 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,67-1,55 (м, 7H), 1,62 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,15 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,04 (с, 9H).

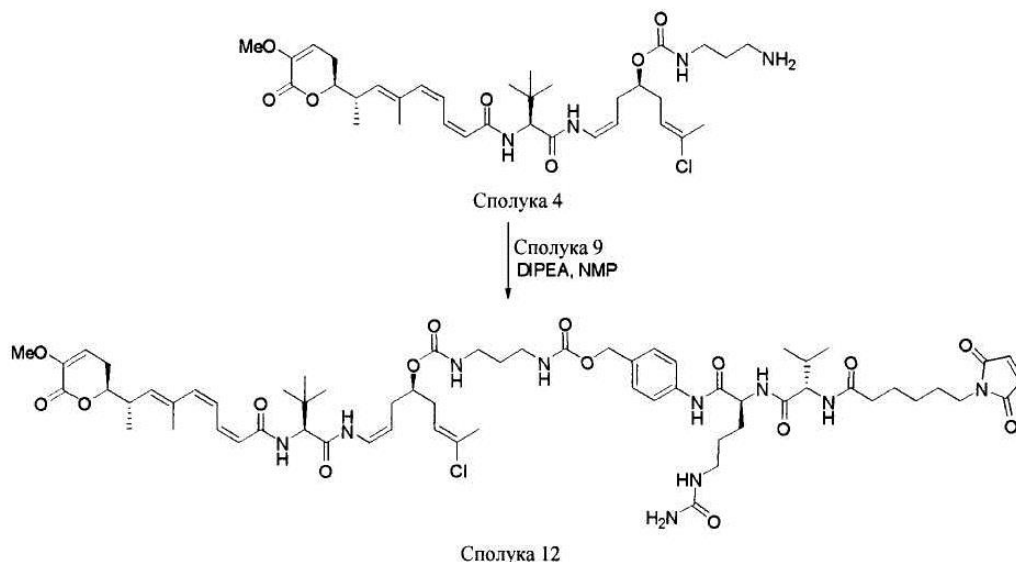
¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 173,6, 170,8, 168,2, 166,4, 161,6, 157,4, 145,2, 140,2, 137,4, 134,2, 134,1, 134,0, 127,0, 124,9, 123,9, 120,7, 108,3, 106,5, 81,8, 75,3, 60,6, 55,4, 37,7, 37,6, 37,2, 36,3, 36,0, 34,7, 31,8, 31,6, 31,1, 29,9, 28,3, 26,7, 26,4, 26,2, 25,2, 22,6, 17,2, 16,6.

5

ESI-MS m/z: розраховано для C₄₄H₆₃N₅O₁₀: 821,5; знайдено: 822,4 (M+H)⁺.

Приклад 3

Одержання Сполуки 12



10 (а) Одержання Сполуки 12

DIPEA (25 мкл, 0,14 ммоль) додавали до розчину Сполуки 9 (94,5 мг, 0,13 ммоль), одержаної, як показано в прикладі одержання вище, і Сполуки 4 (85 мг, 0,13 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 1(b) вище, у NMP (6,5 мл) при 23°C. Через 9 годин реакційну суміш розбавляли за допомогою H₂O і екстрагували за допомогою EtOAc. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, DCM:CH₃OH, від 100:0 до 90:10). Наприкінці, очищення цільової Сполуки 12 (35,7 мг, 22 %) здійснювали за допомогою напівліпрепаративної ВЕРХ (Symmetry C18, 7 мкм, 19×150 мм, градієнт H₂O+CH₃CN, швидкість потоку 15 мл/хв., УФ-детекція).

20

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃/CD₃OD): δ 7,49 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,22 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,19 (т, J=11,8 Гц, 1H), 6,96 (дд, J=23,5, 8,9 Гц, 1H), 6,84 (т, J=11,5 Гц, 1H), 6,70-6,64 (м, 1H), 6,64 (с, 2H), 6,10 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,93 (т, J=6,2 Гц, 1H), 5,82 (т, J=6,2 Гц, 1H), 5,69 (д, J=11,4 Гц, 1H), 5,61 (дд, J=6,3, 3,1 Гц, 1H), 5,54 (т, J=7,8 Гц, 1H), 5,22 (д, J=9,7 Гц, 1H), 4,96 (с, 2H), 4,75 (кв., J=8,1 Гц, 1H), 4,55-4,49 (м, 2H), 4,43-4,36 (м, 1H), 4,23-4,10 (м, 2H), 3,59 (с, 3H), 3,44 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,18-3,04 (м, 8H), 2,82-2,72 (м, 1H), 2,49-2,34 (м, 3H), 2,27 (т, J=7,1 Гц, 2H), 2,18 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,16-2,06 (м, 1H), 2,01-1,95 (м, 1H), 2,00 (с, 3H), 1,87-1,79 (м, 1H), 1,78 (с, 3H), 1,73-1,40 (м, 11H), 1,35-1,20 (м, 2H), 1,09 (д, J=10,0 Гц, 3H), 0,96 (с, 9H), 0,87 (дд, J=6,8, 4,3 Гц, 6H).

25

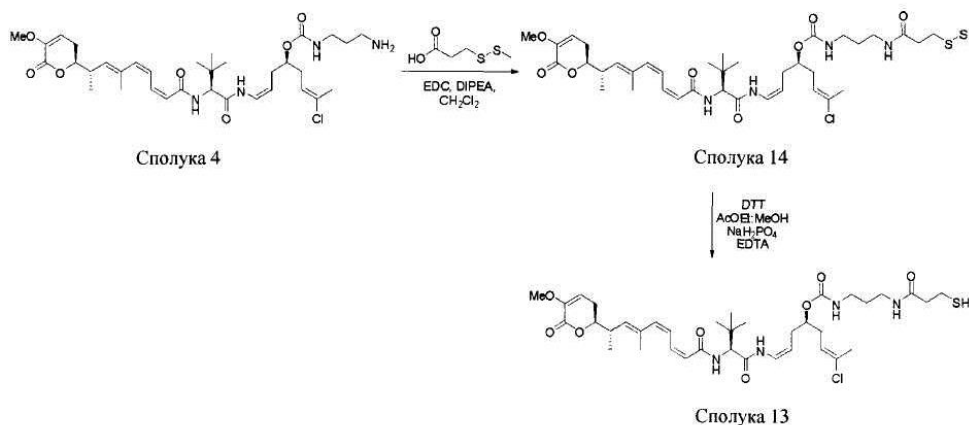
¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 174,1, 172,2, 171,0, 170,3, 168,8, 166,8, 162,1, 160,2, 157,0, 156,9, 144,9, 140,2, 137,7, 137,5, 134,0, 132,4, 131,7, 128,7, 124,0, 123,4, 122,4, 120,4, 119,8, 111,5, 108,6, 107,0, 81,9, 73,8, 68,6, 66,2, 60,3, 58,8, 55,4, 53,0, 37,6, 37,5, 37,1, 35,9, 34,6, 33,2, 30,6, 29,9, 29,2, 28,0, 26,5, 26,2, 26,0, 25,0, 22,6, 20,8, 19,1, 18,2, 17,04, 16,4.

30

ESI-MS m/z: розраховано для C₆₃H₈₉ClN₁₀O₁₅: 1260,6; знайдено: 1261,6 (M+H)⁺.

Приклад 4

Одержання Сполуки 13



(а) Одержання Сполуки 14

До розчину Сполуки 4 (110 мг, 0,17 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 1(б) вище, і 3-(метилдисульфаніл)пропанової кислоти (34 мг, 0,22 ммоль) у DCM (5 мл) додавали N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімідгідрохлорид (EDC) (47,8 мг, 0,22 ммоль) і N, N'-діізопропілетиламін (3,8 мкл, 0,22 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 6 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої Сполуки 14 (123 мг, 93 %).

1H -ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 8,88 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 6,90 (т, $J=11,5$ Гц, 1H), 6,82 (т, $J=9,1$ Гц, 1H), 6,63 (т, $J=6,1$ Гц, 1H), 6,49 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,16 (дд, $J=11,5, 1,5$ Гц, 1H), 5,70 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 5,68-5,51 (м, 3H), 5,29 (д, $J=9,7$ Гц, 1H), 4,81 (кв., $J=8,2$ Гц, 1H), 4,52 (д, $J=9,5$ Гц, 1H), 4,52-4,43 (м, 1H), 4,24 (ддд, $J=11,5, 7,3, 4,3$ Гц, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,37-3,21 (м, 3H), 3,21-3,12 (м, 1H), 2,97 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,90-2,81 (м, 1H), 2,60 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,49-2,35 (м, 3H), 2,39 (с, 3H), 2,33 (т, $J=7,0$ Гц, 2H), 2,14-2,07 (м, 1H), 2,07 (с, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,73-1,64 (м, 2H), 1,16 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, $CDCl_3$): δ 171,6, 168,2, 166,4, 161,6, 157,2, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 131,9, 124,4, 124,1, 122,4, 120,7, 108,3, 105,6, 81,8, 74,8, 60,6, 60,4, 55,5, 37,8, 37,2, 36,2, 35,6, 34,7, 33,1, 31,0, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 21,0, 17,2, 16,6.

(б) Одержання Сполуки 13

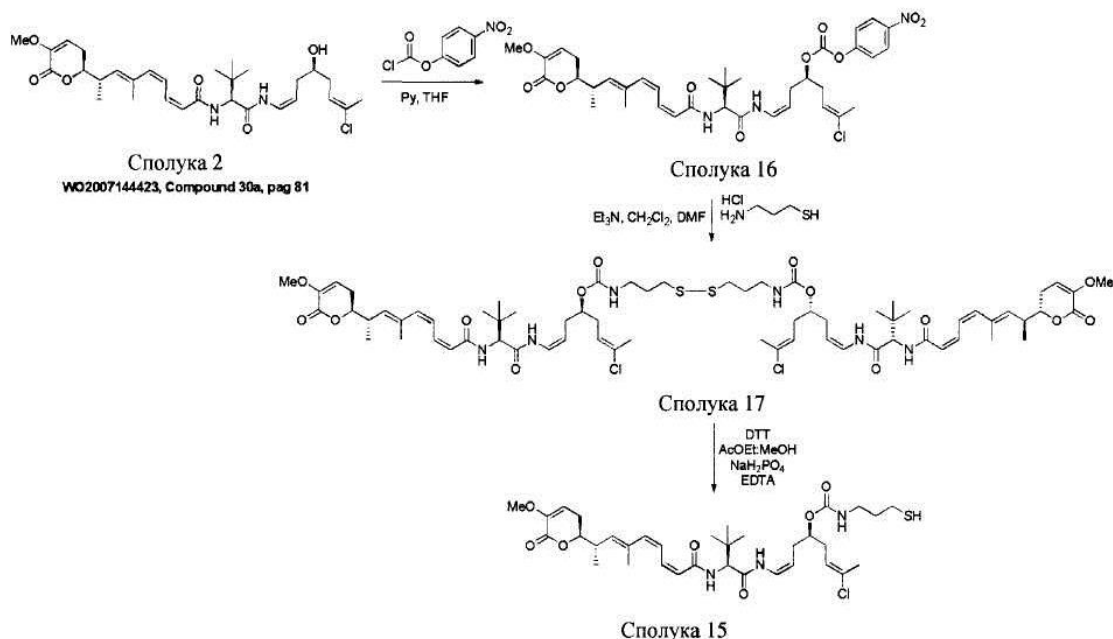
Розчин Сполуки 14 (100 мг, 0,125 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у суміші EtOAc (4,3 мл) і CH_3OH (4,3 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (154,8 мг, 1,0 ммоль) у 0,05М калійфосфатному буфері (4,3 мл) при pH 7,5, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли 0,2М розчином калійфосфатного буфера (13 мл) при pH 6,0, що містить 2 мМ EDTA, і потім екстрагували за допомогою EtOAc. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержану неочищену речовину очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої цільової Сполуки 13 (35 мг, 37 %).

1H -ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 8,91 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 7,27-7,24 (м, 1H), 6,91 (т, $J=11,5$ Гц, 1H), 6,82 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 6,67 (т, $J=6,1$ Гц, 1H), 6,49 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,16 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 5,71 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 5,66-5,57 (м, 3H), 5,29 (д, $J=9,9$ Гц, 1H), 4,84 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,51 (д, $J=9,5$ Гц, 1H), 4,50-4,45 (м, 1H), 4,24-4,20 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,36-3,12 (м, 4H), 2,90-2,71 (м, 3H), 2,64-2,24 (м, 7H), 2,14-2,04 (м, 1H), 2,06 (с, 3H), 1,83 (с, 3H), 1,73-1,68 (м, 2H), 1,15 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

ESI-MS m/z: розраховано для $C_{37}H_{55}ClN_4O_8S$: 750,3; знайдено: 773,2 ($M+Na$)⁺.

Приклад 5

Одержання Сполуки 15



(a) Одержання Сполуки 16

До розчину Сполуки 2 (Сполука 30a, одержана, як описано в WO 2007144423, зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання) (300 мг, 0,53 ммоль) у DCM (5 мл) додавали піридин (85 мкл, 1,06 ммоль) і 4-нітрофенілхлорформіат (214,7 мг, 1,06 ммоль) при 0°C. Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 1,5 години, розбавляли за допомогою 10 % розчину лимонної кислоти й екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Hex:EtOAc) з одержанням чистої Сполуки 16 (307 мг, 80 %).

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,29 (д, J=9,2 Гц, 2H), 8,08 (д, J=10,9 Гц, 1H), 7,44 (д, J=9,1 Гц, 2H), 7,27-7,22 (м, 1H), 6,92-6,83 (м, 2H), 6,20 (д, J=9,2 Гц, 1H), 6,17 (дд, J=11,6, 1,4 Гц, 1H), 5,67-5,58 (м, 3H), 5,29 (д, J=10,0 Гц, 1H), 4,84 (кв., J=8,2 Гц, 1H), 4,77-4,72 (м, 1H), 4,41 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,22 (ддд, J=11,5, 7,5, 4,4 Гц, 1H), 3,67 (с, 3H), 2,89-2,82 (м, 1H), 2,54-2,33 (м, 6H), 2,10 (д, J=1,2 Гц, 3H), 1,85 (д, J=1,3 Гц, 3H), 1,17 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,02 (с, 9H).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 168,4, 166,1, 161,5, 155,3, 152,5, 145,5, 145,2, 140,4, 137,6, 134,3, 134,0, 133,2, 125,3, 124,4, 124,1, 121,8, 121,2, 120,4, 108,1, 104,6, 81,8, 79,1, 60,4, 55,5, 37,3, 34,7, 32,7, 30,1, 26,6, 26,3, 21,1, 17,2, 16,6.

(b) Одержання Сполуки 17

До розчину Сполуки 16 (156,3 мг, 0,21 ммоль) у DCM (2,5 мл) додавали суспензію 3-амінопропан-1-тіолгідрохлориду (44,8 мг, 0,26 ммоль) у DCM (2,5 мл), триетиламін (58 мкл, 0,34 ммоль) і DMF (0,1 мл) при 23°C. Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 3 годин, розбавляли за допомогою H₂O і екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Hex:EtOAc) з одержанням чистої Сполуки 17 (80 мг, 95 %).

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,68 (д, J=10,6 Гц, 1H), 7,28 (т, J=11,6 Гц, 1H), 6,89 (т, J=11,5 Гц, 1H), 6,76 (т, J=9,6 Гц, 1H), 6,65 (д, J=9,1 Гц, 1H), 6,13 (д, J=11,7 Гц, 1H), 5,87-5,51 (м, 4H), 5,28 (д, J=5,0 Гц, 1H), 4,77 (кв., J=8,2 Гц, 1H), 4,61-4,39 (м, 2H), 4,29-4,00 (м, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,31-3,18 (м, 2H), 2,98-2,77 (м, 1H), 2,68 (т, J=7,4 Гц, 2H), 2,55-2,22 (м, 6H), 2,04 (с, 3H), 2,00-1,80 (м, 2H), 1,83 (с, 3H), 1,15 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

ESI-MS m/z: розраховано для C₆₈H₉₈Cl₂N₆O₁₄S₂: 1356,6; знайдено: 1357,3 (M+H)⁺.

(c) Одержання Сполуки 15

Розчин Сполуки 17 (59,4 мг, 0,044 ммоль) у суміші EtOAc (1,5 мл) і CH₃OH (1,5 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (0,35 мл, 0,35 ммоль) у 0,05M калійфосфатному буфері (1,5 мл) при pH 7,5, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли розчином 0,2M калійфосфатного буфера при pH 6,0, що містить 2 мМ розчин EDTA, і екстрагували за допомогою EtOAc (×3). Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і

концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої цільової Сполуки 15 (31 мг, 59 %).

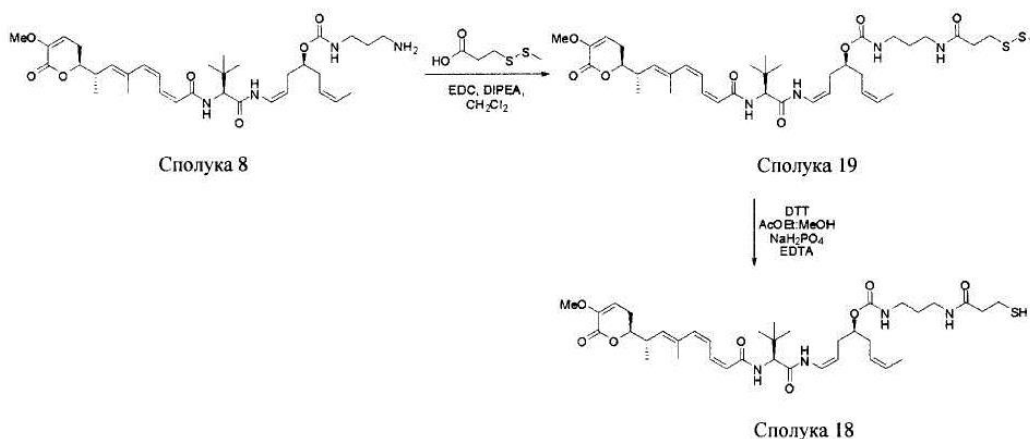
^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,66 (д, $J=10,7$ Гц, 1H), 7,29 (т, $J=11,2$ Гц, 1H), 6,91 (т, $J=11,5$ Гц, 1H), 6,83 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 6,38 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,17 (д, $J=11,8$ Гц, 1H), 5,70 (д, $J=11,4$ Гц, 1H), 5,65-5,51 (м, 2H), 5,34 (т, $J=6,3$ Гц, 1H), 5,29 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 4,82 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,56-4,48 (м, 1H), 4,45 (д, $J=9,3$ Гц, 1H), 4,22 (ддд, $J=11,4$, 7,5, 4,3 Гц, 1H), 3,67 (с, 3H), 3,31 (кв., $J=6,4$ Гц, 2H), 2,88-2,83 (м, 1H), 2,55 (кв., $J=7,7$ Гц, 2H), 2,47-2,30 (м, 5H), 2,12-2,07 (м, 1H), 2,08 (с, 3H), 1,88-1,76 (м, 5H), 1,17 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 1,06 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 168,2, 166,2, 161,5, 156,7, 145,2, 140,2, 137,3, 134,2, 134,0, 132,0, 124,4, 124,2, 122,3, 120,8, 108,1, 105,5, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 39,6, 37,3, 34,6, 33,9, 33,3, 30,8, 26,7, 26,3, 21,8, 21,1, 17,2, 16,7.

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}$: 679,3; знайдено: 702,4 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Приклад 6

Одержання Сполуки 18



(а) Одержання Сполуки 19

До розчину Сполуки 8 (280 мг, 0,45 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 2(b) вище, і 3-(метилдисульфаніл)пропанової кислоти (88 мг, 0,58 ммоль) у DCM (7,5 мл) додавали N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіімідгідрохлорид (EDC) (126 мг, 0,58 ммоль) і N, N'-діізопропілетиламін (0,1 мл, 0,58 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 3 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої Сполуки 19 (240 мг, 71 %).

^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,91 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 7,34-7,20 (м, 1H), 6,89 (т, $J=11,4$ Гц, 1H), 6,83-6,72 (м, 2H), 6,51 (д, $J=9,5$ Гц, 1H), 6,16 (д, $J=11,3$ Гц, 1H), 5,70 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 5,64 (дд, $J=6,1$, 3,3 Гц, 1H), 5,61-5,55 (м, 2H), 5,47-5,33 (м, 1H), 5,28 (д, $J=9,3$ Гц, 1H), 4,84 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,51 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 4,52-4,47 (м, 1H), 4,27-4,19 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,37-3,21 (м, 3H), 3,21-3,12 (м, 1H), 2,96 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,90-2,81 (м, 1H), 2,60 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,43-2,35 (м, 5H), 2,39 (с, 3H), 2,16-2,04 (м, 1H), 1,84 (с, 3H), 1,70-1,61 (м, 5H), 1,16 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 171,5, 168,1, 166,3, 157,4, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 127,0, 124,9, 124,0, 120,8, 108,3, 106,3, 81,8, 75,5, 60,6, 55,4, 53,4, 37,8, 37,2, 36,2, 35,9, 34,7, 33,1, 31,8, 31,2, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 17,2, 16,6, 13,0.

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$: 763,4; знайдено: 762,4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(b) Одержання Сполуки 18

Розчин Сполуки 19 (240 мг, 0,31 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у суміші EtOAc (15 мл) і CH_3OH (22 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (0,79 мл 1,0M розчин, 0,79 ммоль) у 0,05M калійфосфатному буфері (17,4 мл) при pH 7,5, що містить 2 mM етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли розчином 0,2M калійфосфатного буфера (21 мл) при pH 6,0, що містить 2 mM EDTA, і екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержану неочищену речовину очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої цільової Сполуки 18 (105 мг, 47 %).

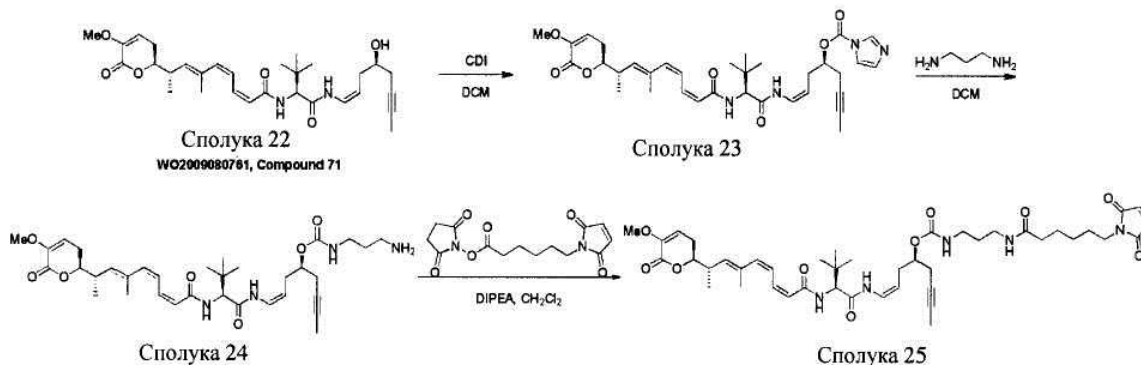
^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8,93 (д, $J=10,6$ Гц, 1H), 7,30-7,22 (м, 1H), 6,90 (т, $J=11,6$ Гц, 1H), 6,86-6,72 (м, 2H), 6,48 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,16 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 5,70 (д, $J=11,4$ Гц, 1H), 5,65-5,55

(м, 3H), 5,48-5,34 (м, 1H), 5,29 (д, J=9,9 Гц, 1H), 4,84 (кв., J=9,4, 8,7 Гц, 1H), 4,52 (д, J=9,5 Гц, 1H), 4,57-4,44 (м, 1H), 4,32-4,17 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,39-3,20 (м, 3H), 3,22-3,09 (м, 1H), 2,90-2,75 (м, 3H), 2,50 (т, J=6,9, 2H), 2,45-2,28 (м, 5H), 2,16-2,08 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,72-1,65 (м, 2H), 1,64 (д, J=6,6 Гц, 3H) 1,16 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

5 ESI-MS m/z: розраховано для C₃₇H₅₆N₄O₈S: 716,4; знайдено: 717,3 (M+H)⁺.

Приклад 7

Одержання Сполуки 25



(а) Одержання Сполуки 23

10 До розчину Сполуки 22 (333 мг, 0,63 ммоль) (Сполука 71, одержана, як описано в WO 2009080761, зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання) у CH₂Cl₂ (12,5 мл) додавали 1,1'-карбонілдіімідазол (308 мг, 1,90 ммоль). Після перемішування при 23°C протягом ночі реакційну суміш концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Нех:ЕтОАс) з одержанням чистої Сполуки 23 (344 мг, 88 %).

15 ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,14 (с, 1H), 8,11 (д, J=10,8 Гц, 1H), 7,43 (с, 1H), 7,28 (т, J=11,6 Гц, 1H), 7,08 (дд, J=1,7, 0,9 Гц, 1H), 6,96-6,81 (м, 2H), 6,26 (д, J=9,3 Гц, 1H), 6,17 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,66 (дт, J=11,4, 1,4 Гц, 1H), 5,62 (дд, J=5,9, 3,5 Гц, 1H), 5,28 (д, J=10,0 Гц, 1H), 5,04-4,89 (м, 1H), 4,80 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,40 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,21 (ддд, J=10,3, 7,5, 5,3 Гц, 1H), 3,65 (с, 3H), 2,91-2,78 (м, 1H), 2,68-2,49 (м, 3H), 2,45-2,31 (м, 2H), 1,89 (т, J=2,5 Гц, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,15 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

20 ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₄₄N₄O₇: 620,32; знайдено: 621,3 (M+H)⁺.

(б) Одержання Сполуки 24

25 До розчину Сполуки 23 (0,130 г, 0,21 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у CH₂Cl₂ (3,5 мл) додавали пропан-1,3-діамін (0,022 мл, 0,26 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 6 годин і потім концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, DCM:CH₃OH, від 100:0 до 97:3) з одержанням Сполуки 24 (120 мг, 91 %).

30 ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,71 (д, J=10,7 Гц, 1H), 7,28 (т, J=11,6 Гц, 1H), 6,91-6,77 (м, 2H), 6,44 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,14 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,77-5,57 (м, 3H), 5,27 (д, J=10,0 Гц, 1H), 4,83 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,57-4,53 (м, 1H), 4,46 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,31-4,11 (м, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,31-3,24 (м, 2H), 2,93-2,67 (м, 3H), 2,56-2,24 (м, 6H), 2,16 (с, 3H), 1,83 (с, 3H), 1,63 (дд, J=9,6, 3,5 Гц, 2H), 1,15 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,04 (с, 9H).

35 ¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 168,3, 166,1, 161,6, 156,5, 145,2, 140,0, 137,2, 134,1, 134,0, 124,3, 124,2, 120,9, 108,1, 106,0, 81,8, 78,4, 74,5, 73,2, 60,6, 55,4, 39,8, 39,2, 37,3, 34,8, 33,0, 30,9, 30,2, 26,7, 26,3, 17,2, 16,7, 3,6.

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₅₀N₄O₇: 626,37; знайдено: 627,3 (M+H)⁺.

(с) Одержання Сполуки 25

40 До розчину Сполуки 24 (40 мг, 0,064 ммоль), одержаної, як описано на стадії (б) вище, у CH₂Cl₂ (2 мл) додавали N-гідроксисукцинімідний ефір 6-малеїмідогексанової кислоти (21,6 мг, 0,07 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі і потім концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Нех:ЕтОАс) з одержанням чистої Сполуки 25 (33,5 мг, 64 %).

45 ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,67 (д, J=10,7 Гц, 1H), 7,29-7,23 (м, 1H), 6,90 (т, J=11,5 Гц, 1H), 6,80 (т, J=9,6 Гц, 1H), 6,68 (с, 2H), 6,46 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,42 (шир.с, 1H), 6,16 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,73-5,67 (м, 2H), 5,64 (дд, J=6,2, 3,1 Гц, 1H), 5,30 (д, J=9,6 Гц, 1H), 4,86 (кв., J=8,4 Гц, 1H), 4,63-4,54 (м, 1H), 4,44 (д, J=9,4 Гц, 1H), 4,30-4,18 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,50 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,34-3,10 (м, 3H), 2,85 (дт, J=9,9, 6,9 Гц, 1H), 2,54-2,37 (м, 4H), 2,36-2,28 (м, 1H), 2,16 (т, J=7,6 Гц, 2H), 1,84

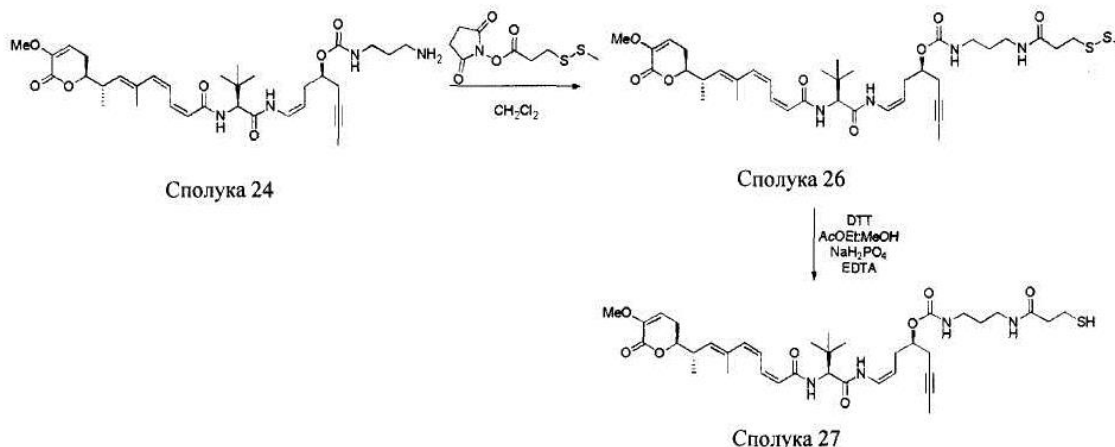
(д, J=1,3 Гц, 3H), 1,83-1,81 (м, 3H), 1,70-1,51 (м, 8H), 1,34-1,23 (м, 2H), 1,16 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 173,4, 170,8, 168,1, 166,4, 161,6, 157,0, 145,2, 140,3, 137,5, 134,3, 134,1, 133,9, 124,2, 120,7, 108,2, 106,2, 81,8, 78,4, 74,3, 73,5, 60,7, 55,4, 37,7, 37,6, 37,3, 36,4, 35,9, 34,6, 32,8, 30,3, 29,9, 28,3, 26,7, 26,4, 26,2, 25,4, 25,2, 24,4, 17,2, 16,6, 3,6.

ESI-MS m/z: розраховано для $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{ClN}_5\text{O}_{10}$: 819,44; знайдено: 820,4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Приклад 8

Одержання Сполуки 27



(а) Одержання Сполуки 26

До розчину Сполуки 24 (70 мг, 0,11 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 7(b) вище, у CH_2Cl_2 (2 мл) додавали N-гідроксисукцинімідний ефір 3-(метилдисульфаніл)пропанової кислоти (36,2 мг, 0,12 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 16 годин і потім концентрували під вакуумом. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої Сполуки 26 (46,3 мг, 61 %) у вигляді білої твердої речовини.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,72 (д, J=10,8 Гц, 1H), 7,29-7,19 (м, 1H), 6,90 (т, J=11,3 Гц, 1H), 6,80 (т, J=9,7 Гц, 1H), 6,69 (т, J=6,1 Гц, 1H), 6,47 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,16 (д, J=11,0 Гц, 1H), 5,69 (д, J=11,5 Гц, 1H), 5,64 (дд, J=6,3, 3,1 Гц, 1H), 5,30 (д, J=0,5 Гц, 1H), 4,86 (кв., J=8,4 Гц, 1H), 4,60-4,54 (м, 1H), 4,46 (д, J=9,4 Гц, 1H), 4,23 (ддд, J=11,5, 7,4, 4,8 Гц, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,33-3,22 (м, 3H), 3,19-3,14 (м, 1H), 2,96 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,66-2,54 (м, 1H), 2,59 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,48-2,42 (м, 5H), 2,40 (с, 3H), 2,38-2,28 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,82 (с, 3H), 1,73-1,64 (м, 2H), 1,16 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 171,5, 168,1, 166,4, 165,2, 157,0, 145,1, 140,4, 137,5, 134,3, 134,0, 124,20, 124,0, 120,7, 108,2, 106,2, 81,8, 78,4, 74,2, 73,6, 60,7, 55,4, 37,8, 37,3, 35,9, 34,6, 33,1, 30,3, 29,8, 26,7, 26,2, 24,4, 23,0, 17,2, 16,6, 3,6.

(b) Одержання Сполуки 27

Розчин Сполуки 26 (44,3 мг, 0,064 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у суміші EtOAc (3,6 мл) і CH_3OH (3,6 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (0,19 мл 1,0М розчину, 0,19 ммоль) у розчині 0,05М калійфосфатного буфера (3,6 мл) при рН 7,5, що містив 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли розчином 0,2М калійфосфатного буфера (21 мл) при рН 6,0, що містить 2 мМ EDTA, і потім екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували під вакуумом. Одержаний неочищений продукт очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc) з одержанням чистої цільової Сполуки 27 (33,6 мг, 74 %) у вигляді білої твердої речовини.

^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,73 (д, J=10,7 Гц, 1H), 7,27 (т, J=11,5 Гц, 1H), 6,91 (тд, J=11,5, 1,1 Гц, 1H), 6,94-6,86 (м, 1H), 6,85-6,77 (м, 1H), 6,43 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,17 (дд, J=12,0, 1,6 Гц, 1H), 5,71 (д, J=11,4 Гц, 1H), 5,65 (дд, J=6,5, 2,9 Гц, 1H), 5,54 (т, J=6,3 Гц, 1H), 5,30 (д, J=10,5 Гц, 1H), 4,84 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,53 (д, J=9,5 Гц, 1H), 4,48-4,44 (м, 1H), 4,24 (ддд, J=11,5, 7,3, 4,2 Гц, 1H), 3,67 (с, 3H), 3,336-3,22 (м, 3H), 3,21-3,10 (м, 1H), 2,89-2,84 (м, 1H), 2,80 (дт, J=8,2, 6,8 Гц, 2H), 2,49 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,45-2,36 (м, 5H), 2,31-2,28 (м, 1H), 1,84 (с, 3H), 1,83 (с, 3H), 1,72-1,69 (м, 2H), 1,16 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

ESI-MS m/z: розраховано для $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$: 714,37; знайдено: 737,3 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Приклад 9

Одержання кон'югата антитіло-лікарський засіб ADC1 з Трастузумабом і Сполукою 1

(a) Часткове відновлення Трастузумабу з одержанням частково відновленого Трастузумабу (Сполука 20)

Трастузумаб (Трастузумаб закуповували у компанії Roche у вигляді білого ліофілізованого порошку для одержання концентрованого розчину для інфузії) у вигляді розчину (9,52 мл, 200 мг, 1,38 мкмоль) розбавляли до концентрації 5 мг/мл з використанням 20 мМ гістидин/ацетатного буфера (pH 5,5, 30,5 мл) з наступним доведенням pH з використанням буфера фосфат/EDTA (pH 8,4, 13 мл). Часткове відновлення дисульфідних зв'язків в антитілі здійснювали шляхом додавання 5,17 мМ трис[2-карбоксіетил]фосфінгідрохлоридного (ТСЕР) розчину (689 мкл, 3,562 мкмоль, 2,6 екв.) Відновну реакцію залишали для перемішування протягом 90 хвилин при 20 °С. Відразу після відновлення, здійснювали аналіз Елмана з одержанням відношення вільного тіолу до антитіла (FTAR) 4,1, дуже близько до значення 4,0, яке було запланованим.

(b) Одержання ADC1

До розчину частково відновленого Трастузумабу, Сполука 20 (24,98 мл, 93,0 мг, 0,64 мкмоль), одержаного, як описано в Прикладі 7(a) вище, додавали DMSO (1,25 мл) з наступним додаванням свіжоприготованого розчину Сполуки 1, одержаної, як описано в Прикладі 1 (10 мМ у DMSO, 366 мкл, 3,66 мкмоль, 5,7 екв.). Після додавання Сполуки 1 розчин ставав дуже каламутним, отже, додатково додавали DMSO (1 мл). Реакційну суміш для кон'югації перемішували протягом 30 хвилин при 20°C і каламутність зникала в процесі реакції кон'югації. Надлишок лікарського засобу гасили шляхом додавання N-ацетилцистеїну (NAC) (10 мМ, 366 мкл, 3,66 мкмоль) з наступним перемішуванням розчину протягом 20 хвилин. Після гасіння реакції кон'югації суміш очищали за допомогою Vivaspin центрифугування і буфер заміняли на кінцевий PBS-буфер. Кінцевий цільовий продукт ADC1 концентрували до кінцевої концентрації 8,56 мг/мл, як було визначено за допомогою УФ-аналізу, і одержували 7,4 мл (63,3 мг, 0,43 мкмоль, 68,0 %) ADC-розчину. Здійснювали аналізи методом ексклюзійної ВЕРХ для визначення чистоти продукту (61,4 %).

ADC1 додатково очищали препаративною гель-фільтраційною хроматографією на системі очищення Äkta з використанням колонки HiLoad 16/600 superdex 200 через присутність великих кількостей агрегатів. Після об'єднання кінцеву концентрацію (1,6 мг/мл) визначали за допомогою УФ-аналізу і чистоту (90,9 %) кінцевих лікарських продуктів визначали методом ексклюзійної ВЕРХ, з одержанням 8,65 мл (13,7 мг, 0,09 мкмоль, 14,7 %) розчину ADC (ADC1).

Приклад 10

Одержання кон'югата антитіло-лікарський засіб ADC2 з Трастузумабом і Сполукою 5

(a) Часткове відновлення Трастузумабу з одержанням частково відновленого Трастузумабу (Сполука 20)

Розчин Трастузумабу (14,29 мл, 300 мг, 2,06 мкмоль) розбавляли до концентрації 5 мг/мл з використанням 20 мМ гістидин/ацетатного буфера (pH 5,5, 45,74 мл), з наступним доведенням pH з використанням буфера фосфат/EDTA (pH 8,4, 14,4 мл). Часткове відновлення дисульфідних зв'язків в антитілі здійснювали шляхом додавання 5 мМ трис[2-карбоксіетил]фосфінгідрохлоридного (ТСЕР) розчину (1,07 мл, 5,36 мкмоль, 2,6 екв.). Відновну реакцію залишали для перемішування протягом 90 хвилин при 20 °С. Відразу після відновлення здійснювали аналіз Елмана з одержанням відношення вільного тіолу до антитіла (FTAR) 4,1, дуже близько до значення 4,0, яке було запланованим.

(b) Одержання ADC2

До розчину частково відновленого Трастузумабу, Сполука 20 (23,6 мл, 93,8 мг, 0,645 мкмоль), одержаного, як описано в Прикладі 8(a) вище, додавали DMSO (1,18 мл) з наступним додаванням свіжоприготованого розчину Сполуки 5, одержаної, як описано в Прикладі 2 (10 мМ у DMSO, 368 мкл, 3,68 мкмоль, 5,7 екв.). Лікарський засіб-лінкер обережно додавали 10 порціями. Після додавання шостої порції розчин ставав злегка каламутним, і каламутність не зникала в процесі реакції кон'югації і гасіння. Реакційну суміш для кон'югації перемішували протягом 30 хвилин при 20°C. Надлишок лікарського засобу гасили шляхом додавання N-ацетилцистеїну (NAC) (10 мМ, 368 мкл, 3,68 мкмоль) при перемішуванні розчину протягом 46 хвилин. Розчин фільтрували через 0,2 мкм шприцевий фільтр. Після гасіння реакції кон'югації суміш концентрували до 16,5 мг/мл за допомогою Vivaspin центрифугування й очищали на колонках NAP-25. Здійснювали аналізи методом ексклюзійної ВЕРХ для визначення чистоти продукту (36,1 %).

ADC2 додатково очищали препаративною гель-фільтраційною хроматографією на системі очищення Äkta з використанням колонки HiLoad 16/600 superdex 200 через присутність великих кількостей агрегатів. Після об'єднання кінцеву концентрацію (3,7 мг/мл) визначали за допомогою

УФ-аналізу і чистоту (78,3 %) кінцевого цільового продукту ADC визначали методом ексклюзійної ВЕРХ, з одержанням 5,3 мл (19,4 мг, 19,4 %) розчину ADC (ADC2).

Приклад 11

Одержання кон'югата антитіло-лікарський засіб ADC3 з Трастузумабом і Сполукою 12

5 (а) Одержання ADC3

До розчину частково відновленого Трастузумабу, Сполука 20 (23,6 мл, 93,8 мг, 0,645 мкмоль), одержаного, як описано в Прикладі 10(а) вище, додавали DMSO (1,18 мл), з наступним додаванням свіжоприготованого розчину Сполуки 12, одержаної, як описано в Прикладі 3 (10 мМ у DMSO, 369 мкл, 3,69 мкмоль, 5,7 екв.). Лікарський засіб-лінкер обережно додавали 10 порціями, не зважаючи на це розчин починав каламутніти після додавання третьої порції. Сильну каламутність спостерігали при додаванні двох останніх порцій. Розчин не ставав прозорим аж до стадії фільтрування. Реакційну суміш для кон'югації перемішували протягом 31 хвилини при 20°C. Надлишок лікарського засобу гасили шляхом додавання N-ацетилцистеїну (НАС) (10 мМ, 369 мкл, 3,69 мкмоль) при перемішуванні реакційної суміші протягом 50 хвилин. Після гасіння реакції кон'югації розчин фільтрували через 0,2 мкм шприцевий фільтр і концентрували до 14,2 мг/мл за допомогою Vivaspin центрифугування. Потім суміш очищали на колонках NAP-25. Здійснювали аналізи методом ексклюзійної ВЕРХ для визначення чистоти продукту (34,2 %).

ADC3 додатково очищали препаративною гель-фільтраційною хроматографією на системі очищення Äkta з використанням колонки HiLoad 16/600 superdex 200 через присутність великих кількостей агрегатів. Після об'єднання кінцевої концентрації (2,3 мг/мл) визначали за допомогою УФ-аналізу і чистоту (78,6 %) кінцевих лікарських продуктів визначали методом ексклюзійної ВЕРХ, з одержанням 7,3 мл (16,6 мг, 16,6 %) розчину ADC (ADC3).

Приклад 12

25 Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC4, 5 і 6 з Трастузумабом і Сполуками 13, 15 і 18, відповідно

(а) SMCC-кон'югація з Трастузумабом (Сполука 21)

Буфер розчину Трастузумабу (262 мг, 1,8 мкмоль) заміняли фосфатним буфером (50 мМ фосфату, 2 мМ EDTA, pH 6,5) з використанням колонок NAP-25. До об'єднаного розчину Трастузумабу в скляних реакторах (16-17 г/л) додавали DMSO (5 %). Кон'югацію лінкера починали шляхом додавання SMCC (20,0 мМ, 8,0 екв.) до розчину Трастузумабу. Реакційну суміш перемішували при 18 °C протягом 3 годин. Реакційну суміш потім очищали на колонках NAP-25 з одержанням Сполуки 21. Здійснювали оберненофазовий аналіз Елмана з визначенням LAR 3,7.

35 (b) Кон'югація Сполук 13, 15 і 18 з Трастузумабом-MCC: одержання ADC4, ADC5 і ADC6

Для реакції кон'югації, на першій стадії розчин кон'югата антитіла, Сполуку 21, розбавляли фосфатним буфером (50 мМ фосфату, 2 мМ EDTA, pH 6,5) до концентрації 10 г/л. Потім DMSO (5 %) додавали до розчину Сполуки 21. Реакції кон'югації зі Сполуками 13, 15 і 18 здійснювали шляхом повільного додавання лікарського засобу (10 мМ, 6,3-6,6 екв.) до розчину Сполуки 21 і перемішування протягом чотирьох годин при 18 °C. Після завершення реакції кон'югації, реакційні суміші фільтрували через 0,2 мкм фільтр і знову очищали на колонках NAP-25 із заміною буфера на 1xPBS-буфер. Здійснювали аналізи методом ексклюзійної ВЕРХ для визначення чистоти продукту і концентрацію кінцевого продукту вимірювали за допомогою УФ-аналізу.

45 ADC з одержання зразка зі Сполукою 15 виділяли з гарною чистотою (74,5 %) і виходом 56 % (49 мг), і додаткове очищення не було потрібне. Кінцеву концентрацію (5,7 мг/мл) розчину ADC5 (87 мл) визначали за допомогою УФ-аналізу.

Однак у двох одержаннях зразків зі Сполуками 13 і 18 були присутні низькомолекулярні сполуки. Ці сполуки мали дуже схожий час утримання з піком продукту і важко піддавалися розділенню на SEC-колонці. Для видалення можливих залишкових кількостей лікарських засобів, що усе ще присутні у розчині, розчини пропускали знову через колонки NAP-25. Хроматограми після першого і другого NAP-25-очищень були ідентичними, тому сполуки не утворювалися з вільних лікарських засобів, що усе ще присутні у розчині, і повинні бути більшими за походженням. Зразки потім додатково очищали гель-фільтраційною хроматографією на ексклюзійній колонці.

Після об'єднання, кінцеві концентрації (2,8 і 3,9 мг/мл) визначали за допомогою УФ-аналізу і чистоту (62,3 % і 50,9 %) кінцевих лікарських продуктів визначали методом ексклюзійної ВЕРХ, з одержанням 6,7 мл (19,3 мг, 22,0 %) ADC4-розчину і 6,8 мл (26,7 мг, 30,5 %) ADC6-розчину, відповідно.

60 Приклад 13

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC7 і 8 з Трастузумабом і Сполуками 25 і 27

(a) Загальні процедури

Концентрацію антитіла перевіряли спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $2,18 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ і молекулярної маси 150 кДа. Буфери, використовувані в цих способах, являли собою або буфер А (50 мМ фосфату натрію, рН 6,5, з 2 мМ EDTA), або буфер В (50 мМ фосфату натрію, рН 8,0), або фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). Відношення лікарського засобу до антитіла (DAR) виводили з відношення лінкера до антитіла (LAR) у випадку кон'югації через Lys або з відношення вільних Cys на моль антитіла у випадку Cys-орієнтованої кон'югації, виходячи з того, що реакція кон'югації лікарського засобу-лінкера або з малеїмідним лінкером, або з вільним Cys є кількісною. Обидва визначення були основані на колориметричній реакції 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) (DTNB) з вільними тиольними групами з утворенням забарвленого тіонітробензоатного продукту приєднання. Для LAR-визначення, продукт приєднання був попередньо утворений шляхом змішування рівних об'ємів 200 мкМ розчину DTNB у буфері В з 200 мкМ розчином N-ацетилцистеїну в такому ж буфері. 75 мкл цієї суміші потім змішували з 75 мкл випробовуваного зразка і після 1-годинної інкубації поглинальну здатність при 412 нм визначали спектрофотометрично й одержане значення порівнювали зі значенням, одержаним зі стандартної кривої, з використанням відомих концентрацій N-гідроксисукцинімідного ефіру 4-(N-малеїмідометил)циклогексанкарбонової кислоти (SMCC) з одержанням концентрації малеїмідів у зразку. Цю концентрацію потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку LAR. Подібним чином, вільні Cys визначали шляхом змішування 50 мкл випробовуваного зразка з 150 мкл 133 мкМ DTNB у буфері В, відслідковуючи поглинальну здатність при 412 нм і порівнюючи одержане значення зі значеннями, одержаними зі стандартної кривої з використанням відомих концентрацій Cys, розраховану концентрацію вільних Cys у випробовуваному зразку потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку відношення.

(b) Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Коли цитотоксичне корисне навантаження кон'югували з Cys-залишками (як у випадку Сполуки 25 для одержання ADC7), антитіло попередньо відновлювали з використанням трис(2-карбоксіетил)фосфінгідрохлориду (TCEP). Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчину антитіла в буфері В змішували з придатною кількістю 5 мМ розчину TCEP у воді для підтримання відновника в 2,5-кратному надлишку відносно антитіла. Суміш інкубували і перемішували протягом 60 хвилин при 20°C і потім невелику аліквоту одержаного відновленого антитіла виділяли для розрахунку відношення вільних Cys до антитіла, при цьому зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину Сполуки 25 у DMSO для досягнення 6-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що відновлене антитіло звичайно представляє менше ніж 6 вільних Cys на молекулу білка, молярне відношення сполуки до доступних вільних Cys ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.) і суміш інкубували протягом 30 хвилин при 20°C. Потім додавали N-ацетилцистеїн для гасіння реакції з використанням придатного об'єму 10 мМ розчину у воді для відповідності концентрації лікарського засобу-лінкера. Одержаний кон'югат наприкінці очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, забезпеченої колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 2 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Коли цитотоксичне корисне навантаження кон'югували з Lys-залишками (як у випадку Сполуки 27 для одержання ADC8), антитіло попередньо активували за допомогою SMCC. Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері А змішували з придатною кількістю 20 мМ розчину SMCC у DMSO з підтриманням активуючого реагенту у 8-кратному надлишку відносно антитіла. Додавали DMSO, якщо необхідно, для досягнення кінцевої концентрації DMSO 5 % (об./об.). Суміш інкубували і перемішували протягом 3 годин при 18 °C і надлишок

SMCC потім видаляли гель-фільтраційною хроматографією на Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Невелику аліквоту одержаного активованого антитіла виділяли для розрахунку LAR і зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину Сполуки 27 у DMSO з одержанням 8-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що LAR-значення ніколи не перевищує 8, це гарантує, що молярне відношення сполуки до доступних ділянок взаємодії ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.). Суміш інкубували протягом 4 годин при 18 °C і одержаний кон'югат очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, оснащеної колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 2 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Приклад 14

Одержання анти-CD4, анти-CD5 і анти-CD13 моноклональних антитіл

Анти-CD4, анти-CD5 і анти-CD13 моноклональні антитіла одержували, додержуючись добре відомих процедур, традиційно використовуваних у даній галузі. Коротко, BALB/с мишей імунізували клітинами HPB-ALL (для кінцевої продукції анти-CD4 антитіла) або людськими Т-клітинами, активованими сумішшю форбол-12-міристан-13-ацетату і комерційно доступного анти-CD3 моноклонального антитіла, як описано Cebrian et al. (1988, J. Exp. Med. 168:1621-1637) (для кінцевої продукції анти-CD5 антитіла) або людськими ендотеліальними клітинами, виділеними з пуповини (для кінцевої продукції анти-CD13 антитіла). Для цієї мети, 1.5E7 відповідних клітин вводили мишам шляхом ін'єкції інтраперитонеально в дні -45 і -30 і внутрішньовенно в день -3. У день 0 у цих тварин видаляли селезінку і здійснювали злиття клітин селезінки з SP2 мишачими мієломними клітинами при співвідношенні 4:1 згідно зі стандартними процедурами з одержанням відповідних гібридом і розподіляли в 96-ямкові планшети для культур тканини (Costar Corp., Cambridge, MA). Через 2 тижні супернатанти культури гібридом збирали і їх реактивність проти клітинної лінії, використовуваної на стадії імунізації, випробували методом проточної цитометрії. Позитивні супернатанти аналізували методом імунофлуоресценції, забарвлюючи відповідні клітини, використовувані як антигени. Гібридами, що показують специфічне забарвлення, картину імунопреципітації і клітинну дистрибуцію, відбирали і клонували і субклонували методом серійних розведень.

Після відбору клонів, клітини культивували в середовищі RPMI-1640, доповненому 10 % (об./об.) фетальною телячою сироваткою, 2 мМ глутаміну, 100 Од./мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину, при 37 °C протягом 3-4 днів, поки середовище не ставало блідо-жовтим. У цей момент, дві третини об'єму середовища видаляли, центрифугували при 1000×g протягом 10 хвилин для осадження клітин і супернатант або знову центрифугували для подальшого очищення при 3000×g протягом 10 хвилин, або фільтрували через мембрани з розміром пор 22 мкм. Очищений супернатант піддавали преципітації з використанням 55 % насиченого розчину сульфату амонію й одержаний осад ресуспендували в 100 мМ Tris-HCl, pH 7,8 (1 мл на 100 мл вихідного очищеного супернатанту), і діалізували при 4 °C протягом 16-24 годин проти 5 л 100 мМ Tris-HCl, pH 7,8, з 150 мМ NaCl, замінюючи діалізуючий розчин щонайменше три рази. Діалізовану речовину наприкінці завантажували на колонку Protein A-Sepharose і відповідне моноклональне антитіло елюювали за допомогою 100 мМ цитрату натрію, pH 3,0, або альтернативно за допомогою 1М гліцину, pH 3,0. Ті фракції, що містили антитіло, нейтралізували за допомогою 2М Tris-HCl, pH 9,0, і на завершення діалізували проти PBS і зберігали при -80 °C до використання.

Приклад 15

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC9, 10 і 11 з анти-CD13 і Сполуками 1, 12 і 13

(а) Загальні процедури

В усіх способах, описаних у даній заявці, концентрацію антитіла перевіряли спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $2,25E5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ і молекулярної маси 150 кДа.

Буфери, використовувані в цих способах, являли собою або буфер А (50 мМ фосфату натрію, рН 6,5, з 2 мМ EDTA), або буфер В (50 мМ фосфату натрію, рН 8,0), або фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). Відношення лікарського засобу до антитіла (DAR) виводили з відношення лінкера до антитіла (LAR) у випадку кон'югації через Lys або з відношення вільних Cys на моль антитіла у випадку Cys-орієнтованої кон'югації, виходячи з того, що реакція кон'югації лікарського засобу-лінкера або з малеїмідним лінкером, або з вільним Cys є кількісною. Обидва визначення були основані на колориметричній реакції 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) (DTNB) з вільними тиольними групами з утворенням забарвленого тіонітробензоатного продукту приєднання. Для LAR-визначення, продукт приєднання був попередньо утворений шляхом змішування рівних об'ємів 200 мкМ розчину DTNB у буфері В з 200 мкМ розчином N-ацетилцистеїну в такому ж буфері. 75 мкл цієї суміші потім змішували з 75 мкл випробовуваного зразка і після 1-годинної інкубації поглинальну здатність при 412 нм визначали спектрофотометрично й одержане значення порівнювали зі значенням, одержаним зі стандартної кривої з використанням відомих концентрацій N-гідроксисукцинімідного ефіру 4-(N-малеїмідометил)циклогексанкарбонової кислоти (SMCC) з одержанням концентрації малеїмідів у зразку. Цю концентрацію потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку LAR. Подібним чином, вільні Cys визначали шляхом змішування 50 мкл випробовуваного зразка з 150 мкл 133 мкМ DTNB у буфері В, відслідковуючи поглинальну здатність при 412 нм і порівнюючи одержане значення зі значеннями, одержаними зі стандартної кривої, з використанням відомих концентрацій Cys; розраховану концентрацію вільних Cys у випробовуваному зразку потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку відношення.

(b) Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Коли цитотоксичне корисне навантаження кон'югували з Cys-залишками (як у випадку Сполуки 1 для одержання ADC9 або Сполуки 12 для одержання ADC10), антитіло попередньо відновлювали з використанням трис(2-карбоксіетил)фосфінгідрохлориду (TCEP). Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері В змішували з придатною кількістю 5 мМ розчину TCEP у воді з підтриманням відновника в 2,5-кратному надлишку відносно антитіла. Суміш інкубували і перемішували протягом 60 хвилин при 20 °C і потім невелику аліквоту одержаного відновленого антитіла виділяли для розрахунку відношення вільних Cys до антитіла, при цьому зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину лінкера, що містить лікарський засіб (Сполука 1 для ADC9 або Сполука 12 для ADC10), у DMSO для досягнення 6-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що відновлене антитіло звичайно представляє менше ніж 6 вільних Cys на молекулу білка, молярне відношення сполуки до доступних вільних Cys ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.), і суміш інкубували протягом 30 хвилин при 20 °C. Потім додавали N-ацетилцистеїн для гасіння реакції, з використанням придатного об'єму 10 мМ розчину у воді для відповідності концентрації лікарського засобу-лінкера. Одержаний кон'югат наприкінці очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, забезпеченої колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 2 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Коли цитотоксичне корисне навантаження кон'югували з Lys-залишками (як у випадку Сполуки 13 для одержання ADC11), антитіло попередньо активували за допомогою SMCC. Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері А змішували з придатною кількістю 20 мМ розчину SMCC у DMSO, з підтриманням активуючого реагенту у 8-кратному надлишку відносно антитіла. Додавали DMSO, якщо необхідно, для досягнення кінцевої концентрації DMSO 5 % (об./об.). Суміш інкубували і перемішували протягом 3 годин при 18 °C і надлишок SMCC потім видаляли гель-фільтраційною хроматографією на Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Невелику аліквоту одержаного активованого антитіла виділяли для розрахунку LAR і зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину Сполуки 13 у DMSO з одержанням 8-кратного надлишку сполуки відносно антитіла;

враховуючи, що LAR-значення ніколи не перевищує 8, це гарантує, що молярне відношення сполуки до доступних ділянок взаємодії ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.). Суміш інкубували протягом 4 годин при 18 °C і одержаний кон'югат очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, оснащеної колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 2 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Приклад 16

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC12 і 13 з Ритуксимабом і Сполуками 1 і 12

(а) Загальні процедури

Концентрацію антитіла перевіряли спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $2,08 \text{E}5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ і молекулярної маси 150 кДа. Буфери, використовувані в цих способах, являли собою або буфер В (50 мМ фосфату натрію, рН 8,0), або фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). Відношення лікарського засобу до антитіла (DAR) виводили з відношення вільних Cys на моль антитіла, виходячи з того, що реакція кон'югації лікарського засобу-лінкера з вільними Cys є кількісною. Визначення було ґрунтоване на колориметричній реакції 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) (DTNB) з вільними тіольними групами з утворенням забарвленого тіонітробензоатного продукту приєднання. 50 мкл випробовуваного зразка змішували з 150 мкл 133 мкМ DTNB у буфері В, потім вимірювали поглинальну здатність при 412 нм і одержане значення порівнювали зі значеннями, одержаними зі стандартної кривої, з використанням відомих концентрацій Cys. Розраховану концентрацію вільних Cys у випробовуваному зразку потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку відношення.

(б) Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Перед кон'югацією з лікарським засобом-лінкерами через Cys, антитіло відновлювали з використанням трис(2-карбоксіетил)фосфінгідрохлориду (TCEP). Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері В змішували з придатною кількістю 5 мМ розчину TCEP у воді, з підтриманням відновника в 2,5-кратному надлишку відносно антитіла. Суміш інкубували і перемішували протягом 60 хвилин при 20°C і потім невелику аліквоту одержаного відновленого антитіла виділяли для розрахунку відношення вільних Cys до антитіла, при цьому зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину лікарського засобу-лінкера (Сполука 1 для ADC12 або Сполука 12 для ADC13) у DMSO для досягнення 6-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що відновлене антитіло звичайно представляє менше ніж 6 вільних Cys на молекулу білка, молярне відношення сполуки до доступних вільних Cys ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.), і суміш інкубували протягом 30 хвилин при 20°C. Потім додавали N-ацетилцистеїн для гасіння реакції, з використанням придатного об'єму 10 мМ розчину у воді для відповідності концентрації лікарського засобу-лінкера. Одержаний кон'югат наприкінці очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, оснащеної колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 1 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Приклад 17

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC14 і 15 з анти-CD5 і Сполуками 1 і 12

(a) Загальні процедури

Концентрацію антитіла перевіряли спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $2,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ і молекулярної маси 150 кДа. Буфери, використовувані в цих способах, являли собою або

5 буфер В (50 мМ фосфату натрію, рН 8,0), або фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). Відношення лікарського засобу до антитіла (DAR) виводили з відношення вільних Cys на моль антитіла, виходячи з того, що реакція кон'югації лікарського засобу-лінкера з вільними Cys є кількісною. Визначення було основане на колориметричній реакції 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної

10 кислоти) (DTNB) з вільними тиольними групами з утворенням забарвленого тіонітробензоатного продукту приєднання. 50 мкл випробовуваного зразка змішували з 150 мкл 133 мкМ DTNB у буфері В, поглинальну здатність при 412 нм потім вимірювали й одержане значення порівнювали зі значеннями, одержаними зі стандартної кривої, з використанням відомих концентрацій Cys. Розраховану концентрацію вільних Cys у випробовуваному зразку потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку відношення.

(b) Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Перед кон'югацією з лікарським засобом-лінкерами через Cys, антитіло відновлювали з використанням трис(2-карбоксietил)фосфінгідрохлориду (TCEP). Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері В змішували з придатною кількістю 5 мМ розчину TCEP у воді, з підтриманням відновника в 2,5-кратному надлишку відносно антитіла. Суміш інкубували і

20 перемішували протягом 60 хвилин при 20 °C і потім невелику аліквоту одержаного відновленого антитіла виділяли для розрахунку відношення вільних Cys до антитіла, при цьому зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину лікарського засобу-лінкера (Сполука 1 для ADC14 або Сполука 12 для ADC15) у DMSO для досягнення 6-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що відновлене антитіло звичайно представляє менше ніж 6

25 вільних Cys на молекулу білка, молярне відношення сполуки до доступних вільних Cys ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.), і суміш інкубували протягом 30 хвилин при 20 °C. Потім додавали N-ацетилцистеїн для гасіння реакції, з використанням придатного об'єму 10 мМ розчину у воді для відповідності концентрації лікарського засобу-лінкера. Одержаний кон'югат наприкінці очищали від реагентів,

30 що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, оснащеної колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням

35 такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 1 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-

40 пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Приклад 18

Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб ADC16 і 17 з анти-CD4 і Сполуками 1 і 12

(a) Загальні процедури

Концентрацію антитіла перевіряли спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $2,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ і молекулярної маси 150 кДа. Буфери, використовувані в цих способах, являли собою або

45 буфер В (50 мМ фосфату натрію, рН 8,0), або фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS). Відношення лікарського засобу до антитіла (DAR) виводили з відношення вільних Cys на моль антитіла, виходячи з того, що реакція кон'югації лікарського засобу-лінкера з вільними Cys є кількісною. Визначення було основане на колориметричній реакції 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної

50 кислоти) (DTNB) з вільними тиольними групами з утворенням забарвленого тіонітробензоатного продукту приєднання. 50 мкл випробовуваного зразка змішували з 150 мкл 133 мкМ DTNB у буфері В, потім вимірювали поглинальну здатність при 412 нм і одержане значення порівнювали зі значеннями, одержаними зі стандартної кривої, з використанням відомих

55 концентрацій Cys. Розраховану концентрацію вільних Cys у випробовуваному зразку потім співвідносили з концентрацією антитіла для розрахунку відношення.

(b) Одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Перед кон'югацією з лікарським засобом-лінкерами через Cys, антитіло відновлювали з використанням трис(2-карбоксietил)фосфінгідрохлориду (TCEP). Коротко, 70 мкМ (10,5 мг/мл) розчин антитіла в буфері В змішували з придатною кількістю 5 мМ розчину TCEP у воді, з

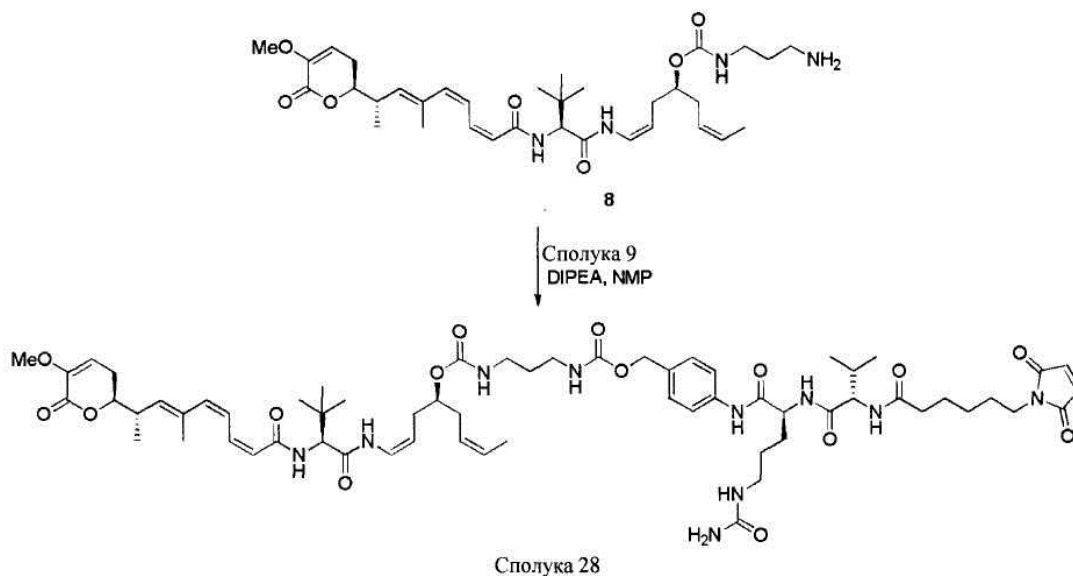
60

підтриманням відновника в 2,5-кратному надлишку відносно антитіла. Суміш інкубували і перемішували протягом 60 хвилин при 20 °C і потім невелику аліквоту одержаного відновленого антитіла виділяли для розрахунку відношення вільних Cys до антитіла, при цьому зразок, що залишився, змішували з придатним об'ємом 10 мМ розчину лікарського засобу-лінкера (Сполука 1 для ADC16 або Сполука 12 для ADC17) у DMSO для досягнення 6-кратного надлишку сполуки відносно антитіла; враховуючи, що відновлене антитіло звичайно представляє менше ніж 6 вільних Cys на молекулу білка, молярне відношення сполуки до доступних вільних Cys ніколи не буває нижче 1. Додавали DMSO, якщо необхідно, з підтриманням його концентрації при 5 % (об./об.), і суміш інкубували протягом 30 хвилин при 20 °C. Потім додавали N-ацетилцистеїн для гасіння реакції, з використанням придатного об'єму 10 мМ розчину у воді для відповідності концентрації лікарського засобу-лінкера. Одержаний кон'югат наприкінці очищали від реагентів, що залишилися, гель-фільтрацією в Sephadex G-25 з використанням колонок PD-10 від GE Healthcare. Присутність агрегатів перевіряли за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії з використанням Äkta FPLC-системи, оснащеної колонкою Superdex-100 10/300, ізократним способом з використанням PBS при 1 мл/хв.; якщо площа піка, що відповідає агрегатам, перевищувала 10 % від загальної площі піків, мономери очищали з використанням такої ж системи хроматографії з Superdex 200 16/600 препаративною колонкою, здійснюючи такий же спосіб, який описаний вище. Кінцеву ADC-концентрацію визначали спектрофотометрично, здійснюючи контроль його поглинальної здатності при 280 нм, з використанням такого ж коефіцієнта молярної екстинкції, як для вихідного антитіла; якщо ADC-концентрація була нижче 1 мг/мл, здійснювали концентрування з використанням Vivaspin-пристроїв від GE Healthcare і знову визначали нову концентрацію, як зазначено вище.

Приклад 19

Синтез сполуки формули D-X-(AA)_w-L₁

Одержання Сполуки 28



(а) Одержання Сполуки 28

DIPEA (10 мкл, 0,06 ммоль) додавали до розчину Сполуки 9 (13 мг, 0,02 ммоль), одержаної, як показано в Прикладі одержання вище, і Сполуки 8 (20 мг, 0,02 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 2 вище, у NMP (6,5 мл) при 23°C. Через 9 годин реакційну суміш розбавляли за допомогою H₂O і екстрагували за допомогою EtOAc. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, DCM:CH₃OH, від 100:0 до 90:10) з одержанням чистої цільової Сполуки 28 (9 мг, 38 %).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃/CD₃OD): δ 9,40 (с, 1H), 8,92 (д, J=10,6 Гц, 1H), 7,67 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,47 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,21 (д, J=7,9 Гц, 2H), 7,16 (т, J=11,9 Гц, 1H), 6,97 (т, J=9,6 Гц, 2H), 6,82 (т, J=11,4 Гц, 1H), 6,67-6,64 (м, 1H), 6,64 (с, 2H), 6,08 (д, J=11,7 Гц, 1H), 5,68 (д, J=11,4 Гц, 1H), 5,62-5,58 (м, 1H), 5,54-5,47 (м, 1H), 5,35-5,29 (м, 1H), 5,20 (д, J=9,9 Гц, 1H), 4,94 (с, 2H), 4,77 (кв., J=8,1 Гц, 1H), 4,54-4,45 (м, 2H), 4,37 (д, J=9,2 Гц, 1H), 4,20-4,12 (м, 1H), 4,08 (т, J=7,8 Гц, 1H), 3,58 (с, 3H), 3,42 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,18-3,00 (м, 7H), 2,81-2,75 (м, 1H), 2,35-2,30 (м, 3H), 2,29-2,25 (м, 3H), 2,17 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,14-2,06 (м, 1H), 2,04-1,92 (м, 1H), 1,86-1,74 (м, 1H), 1,76 (с, 3H),

1,61-1,42 (м, 10H), 1,54 (д, J=6,3 Гц, 3H), 1,30-1,14 (м, 4H), 1,08 (д, J=6,4 Гц, 3H), 0,94 (с, 9H), 0,86 (дд, J=6,8, 4,3 Гц, 6H).

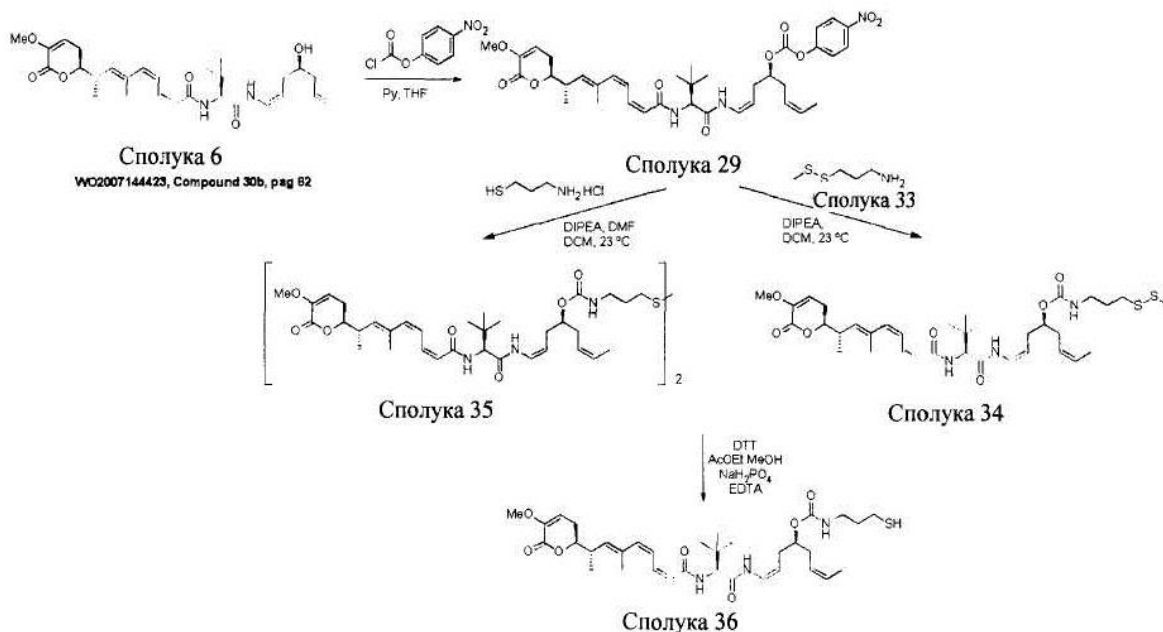
¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ 173,0, 172,1, 171,0, 170,2, 168,5, 167,1, 162,0, 161,3, 157,2, 157,0, 145,0, 140,2, 137,7, 137,5, 137,1, 134,0, 132,4, 128,8, 126,9, 124,9, 124,4, 124,3, 124,0, 120,5, 119,8, 108,6, 107,3, 81,9, 74,8, 66,1, 60,4, 58,8, 55,4, 37,6, 37,2, 36,0, 34,8, 31,9, 31,6, 30,9, 30,7, 30,0, 29,7, 29,3, 28,1, 26,5, 26,2, 26,1, 25,1, 19,2, 18,3, 17,1, 16,5, 12,9.

ESI-MS m/z: розраховано для C₆₃H₉₀N₁₀O₁₅: 1226,7; знайдено: 1267,4 (M+H)⁺.

Приклад 20

Синтез сполуки формули D-X-(AA)_w-H

Одержання Сполуки 36

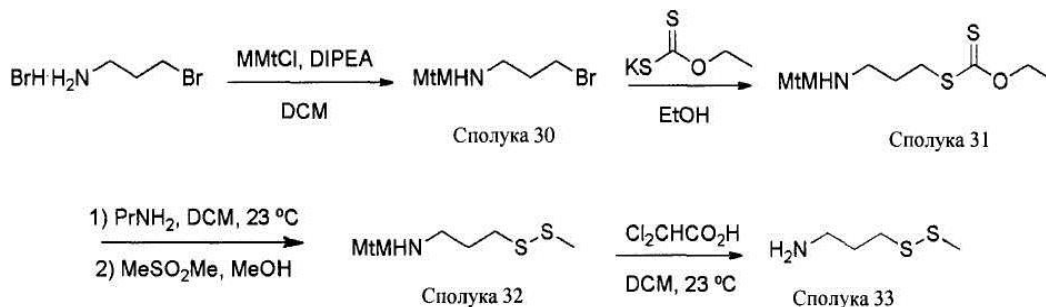


(а) Одержання Сполуки 29

До розчину Сполуки 6 (1,01 г, 1,91 ммоль) (Сполука 30b, одержана, як описано в WO 2007144423, зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання) у DCM (40 мл) додавали піридин (0,31 мл, 3,82 ммоль) і 4-нітрофенілхлорформіат (769,7 мг, 3,82 ммоль) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при 23 °С протягом 1,5 години, розбавляли лимонною кислотою 10 % і екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Hex:EtOAc суміші) з одержанням чистої Сполуки 29 (783 мг, 59 %).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,26 (д, J=9,2 Гц, 2H), 8,02 (д, J=10,9 Гц, 1H), 7,43 (д, J=9,2 Гц, 2H), 7,22 (т, J=9,2 Гц, 1H), 6,92-6,76 (м, 2H), 6,21 (д, J=9,3 Гц, 1H), 6,17-6,12 (м, 1H), 5,73-5,64 (м, 1H), 5,65-5,56 (м, 2H), 5,46-5,38 (м, 1H), 5,27 (д, J=9,9 Гц, 1H), 4,86 (кв., J=8,2 Гц, 1H), 4,76 (п, J=6,2 Гц, 1H), 4,40 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,21 (ддд, J=10,7, 7,6, 4,9 Гц, 1H), 3,66 (с, 3H), 2,89-2,79 (м, 1H), 2,59-2,29 (м, 6H), 1,83 (д, J=1,3 Гц, 3H), 1,61 (с, 3H), 1,16 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,00 (с, 9H).

(b) Одержання Сполуки 33



Одержання Сполуки 30

До розчину 3-бромпропіламінідгидроброміду (1,22 г, 2,98 ммоль) у CH₂Cl₂ (30 мл) додавали 4-метокситрифенілметилхлорид (5,89 г, 19,1 ммоль) і DIPEA (6,3 мл, 36,38 ммоль). Реакційну

суміш перемішували при 23°C протягом ночі, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою CH_2Cl_2 . Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс суміші) з одержанням чистої Сполуки 30 (8,16 г, 100 %) у вигляді білої твердої речовини.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,50-7,42 (м, 4Н), 7,39-7,33 (м, 2Н), 7,29-7,22 (м, 4Н), 7,22-7,15 (м, 2Н), 6,81 (д, $J=8,9$ Гц, 2Н), 3,78 (с, 3Н), 3,56 (т, $J=6,8$ Гц, 2Н), 2,26 (т, $J=6,7$ Гц, 2Н), 2,07-1,96 (м, 2Н).

Одержання Сполуки 31

До розчину Сполуки 30 (1,49 г, 3,63 ммоль) у етанолі (36 мл) додавали етилксантогенат калію (1,46 г, 9,08 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі й осаджений бромід калію потім фільтрували з розчину. Фільтрат упарювали при зниженому тиску і потім твердий залишок розтирали в порошок з гексаном. Тверду речовину, що утворилася, видаляли фільтруванням і фільтрат упарювали й очищали флеш-хроматографією (SiO_2 , Нех/ЕтОАс суміші) з одержанням Сполуки 31 (1,31 г, 80 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,50-7,42 (м, 4Н), 7,39-7,33 (м, 2Н), 7,29-7,22 (м, 4Н), 7,22-7,15 (м, 2Н), 6,81 (д, $J=8,9$ Гц, 2Н), 4,62 (кв., $J=7,1$ Гц, 2Н), 3,78 (с, 3Н), 3,32-3,20 (дд, $J=7,7$, 6,9 Гц, 2Н), 2,23 (т, $J=6,7$ Гц, 2Н), 1,91-1,80 (м, 2Н), 1,41 (т, $J=7,1$ Гц, 3Н).

Одержання Сполуки 32

До розчину Сполуки 31 (3 г, 6,64 ммоль) у DCM (10 мл) додавали 1-пропіламін (4,4 мл, 66,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23 °C протягом 10 хв. і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок використовували на наступній стадії без додаткового очищення. Його розчиняли в безводному метанолі (50 мл) і охолоджували до 0°C. Додавали метилметантіосульфонат (9,7 мл, 7,97 ммоль) і розчин перемішували протягом 16 годин при 23 °C. Розчинник видаляли у вакуумі, залишкове масло розчиняли в дихлорметані, промивали буфером з рН 7 і насиченим сольовим розчином, сушили й упарювали. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс суміші) з одержанням Сполуки 32 (1,6 г, 59 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,52-7,44 (м, 4Н), 7,38 (д, $J=8,9$ Гц, 2Н), 7,32-7,22 (м, 4Н), 7,19 (д, $J=7,3$ Гц, 2Н), 6,82 (д, $J=8,9$ Гц, 2Н), 3,79 (с, 3Н), 2,90-2,72 (м, 2Н), 2,39 (с, 3Н), 2,24 (т, $J=6,7$ Гц, 2Н), 1,88 (п, $J=6,9$ Гц, 2Н).

Одержання Сполуки 33

До розчину Сполуки 32 (1,22 г, 2,98 ммоль) у CH_2Cl_2 (30 мл) додавали дихлороцтову кислоту (0,9 мл, 10,9 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 20 хв. і розбавляли водою. Органічний шар екстрагували і водну фазу підлюговували за допомогою КОН 10 %. Потім суміш ретельно екстрагували дихлорметаном (3×), і об'єднані органічні екстракти сушили над Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували з одержанням Сполуки 33 (409 мг, 100 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 2,83-2,75 (м, 2Н), 2,41 (с, 3Н), 1,88-1,81 (м, 2Н).

(с) Одержання Сполуки 34

До розчину Сполуки 29 (230,2 мг, 0,33 ммоль), одержаної, як описано на стадії (а) вище, у CH_2Cl_2 (10 мл) додавали Сполуку 33 (50 мг, 0,36 ммоль) і DIPEA (0,06 мл, 0,36 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 3 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою CH_2Cl_2 . Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс суміші) з одержанням чистої Сполуки 34 (150 мг, 66 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,68 (д, $J=10,7$ Гц, 1Н), 7,31 (т, $J=6,0$ Гц, 1Н), 6,90 (дд, $J=12,7$, 10,2 Гц, 1Н), 6,81 (дд, $J=10,9$, 8,5 Гц, 1Н), 6,38 (д, $J=9,4$ Гц, 1Н), 6,16 (д, $J=11,7$ Гц, 1Н), 5,69 (д, $J=11,5$ Гц, 1Н), 5,65-5,52 (м, 3Н), 5,41-5,37 (м, 1Н), 5,29-5,56 (д, $J=8,9$ Гц, 1Н), 4,83 (кв., $J=8,3$ Гц, 1Н), 4,54-4,50 (м, 1Н), 4,46 (д, $J=9,4$ Гц, 1Н), 4,24-4,19 (м, 1Н), 3,65 (с, 3Н), 3,36-3,16 (м, 2Н), 2,86-2,82 (м, 1Н), 2,70 (т, $J=7,2$ Гц, 2Н), 2,44-2,35 (м, 5Н), 2,40 (с, 3Н), 2,19-2,04 (м, 1Н), 1,98-1,83 (м, 2Н), 1,84 (с, 3Н), 1,63 (д, $J=6,6$ Гц, 3Н), 1,16 (д, $J=6,6$ Гц, 3Н), 1,05 (с, 9Н).

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$: 691,33; знайдено: 692,4 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(d) Одержання Сполуки 35

До розчину Сполуки 29 (121,3 мг, 0,17 ммоль), одержаної, як описано для стадії (а) вище, у DCM (2,5 мл) додавали суспензію 3-амінопропан-1-тіолгідрохлориду (37,2 мг, 0,29 ммоль) у DCM (2,5 мл), DIPEA (59 мкл, 0,34 ммоль) і DMF (0,1 мл) при 23°C. Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 7 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою ЕтОАс. Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Нех:ЕтОАс суміші) з одержанням чистої Сполуки 35 (40,5 мг, 37 %).

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,63 (д, J=10,6 Гц, 1H), 7,34-7,21 (м, 1H), 6,88 (т, J=11,4 Гц, 1H), 6,76 (т, J=9,6 Гц, 1H), 6,68 (д, J=9,3 Гц, 1H), 6,13 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,7-5,67 (м, 3H), 5,66-5,48 (м, 3H), 4,81 (кв., J=8,1 Гц, 1H), 4,66-4,50 (м, 1H), 4,46 (д, J=9,2 Гц, 1H), 4,25-4,18 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 3,27-3,34 (м, 1H), 2,88-2,77 (м, 1H), 2,66 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,42-2,30 (м, 5H), 2,22-2,06 (м, 2H), 1,89-1,74 (м, 5H), 1,62 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,15 (д, J=6,7 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

ESI-MS m/z: розраховано для C₆₈H₁₀₀N₆O₁₄S₂: 1288,67; знайдено: 1289,4 (M+H)⁺.

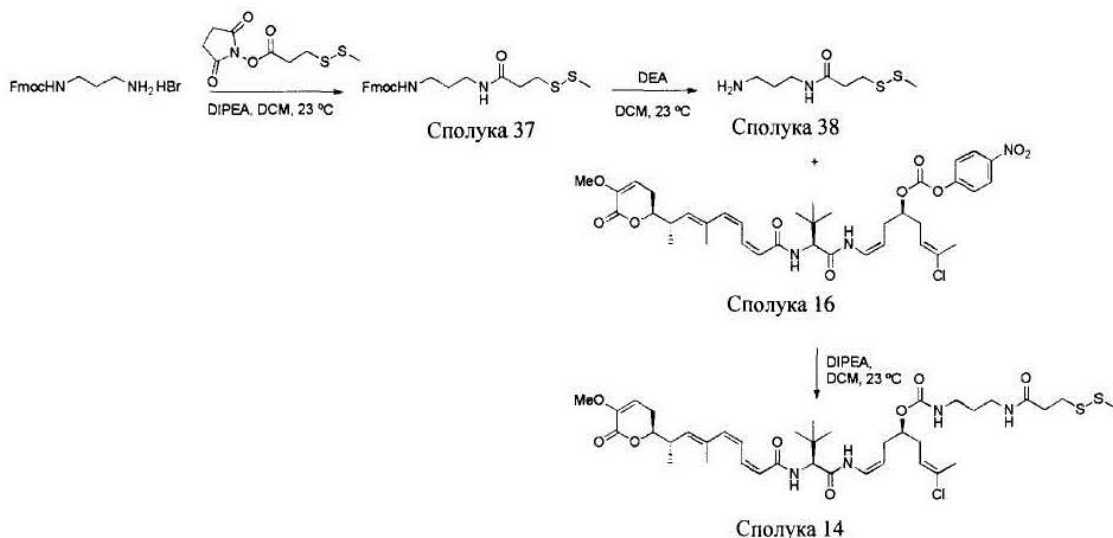
(е) Одержання Сполуки 36

Розчин Сполуки 35 (40,5 мг, 0,03 ммоль) у суміші EtOAc (1,5 мл) і CH₃OH (1,5 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (0,36 мл, 0,36 ммоль) у 0,05М калійфосфатному буфері (1,2 мл) при pH 7,5, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли розчином 0,2М калійфосфатного буфера при pH 6,0, що містить 2 мМ EDTA, і екстрагували за допомогою EtOAc (×3). Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для ВЕРХ (SiO₂, Hex:EtOAc суміші) з одержанням Сполуки 36 (15 мг, 38 %).

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,70 (д, J=10,7 Гц, 1H), 7,35-7,21 (м, 1H), 6,89 (т, J=11,4 Гц, 1H), 6,80 (т, J=9,8 Гц, 1H), 6,42 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,16 (д, J=11,3 Гц, 1H), 5,75-5,48 (м, 3H), 5,52-5,13 (м, 3H), 4,83 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,65-4,38 (м, 2H), 4,32-4,16 (м, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,29 (кв., J=6,6 Гц, 2H), 2,85 (дт, J=9,8, 6,9 Гц, 1H), 2,54 (кв., J=7,3 Гц, 2H), 2,48-2,26 (м, 5H), 2,19-2,01 (м, 1H), 1,89-1,74 (м, 5H), 1,63 (дд, J=6,8, 1,7 Гц, 3H), 1,16 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₅₁N₃O₇S: 645,85; знайдено: 668,4 (M+Na)⁺.

Приклад 21. Альтернативний синтез Сполуки 14



Одержання Сполуки 37

До розчину N-Fmoc-1,3-пропандіамінгідроброміду (377 мг, 1 ммоль) у CH₂Cl₂ (15 мл) додавали DIPEA (0,52 мл, 3 ммоль) і N-гідроксисукцинімідний ефір 6-малеїмідогексанової кислоти (323,7 мг, 1,1 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом ночі і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO₂, Hex:EtOAc суміші) з одержанням чистої Сполуки 37 (430 мг, 100 %) у вигляді білої твердої речовини.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,76 (дд, J=7,6, 1,0 Гц, 2H), 7,64-7,55 (м, 2H), 7,45-7,37 (м, 2H), 7,31 (тд, J=7,5, 1,2 Гц, 2H), 6,16 (bs, 1H), 5,24 (bs, 1H), 4,42 (д, J=6,9 Гц, 2H), 4,21 (т, J=6,8 Гц, 1H), 3,27 (дкв., J=18,3, 6,3 Гц, 4H), 2,99 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,62 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,41 (с, 3H), 1,71-1,59 (м, 2H).

Одержання Сполуки 38

До розчину Сполуки 37 (430 мг, 1 ммоль), одержаної, як описано для стадії (а) вище, у CH₂Cl₂ (8 мл) додавали діетиламін (1,4 мл, 13,5 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 6 годин і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок розтирали в порошок з Et₂O і фільтрували з одержанням Сполуки 38 (148 мг, 71 %) у вигляді білої твердої речовини.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3,29 (тд, J=6,5, 2,3 Гц, 2H), 3,01-2,86 (м, 2H), 2,78 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,57 (т, J=7,1 Гц, 2H), 2,37 (с, 3H), 1,69 (п, J=6,6 Гц, 2H).

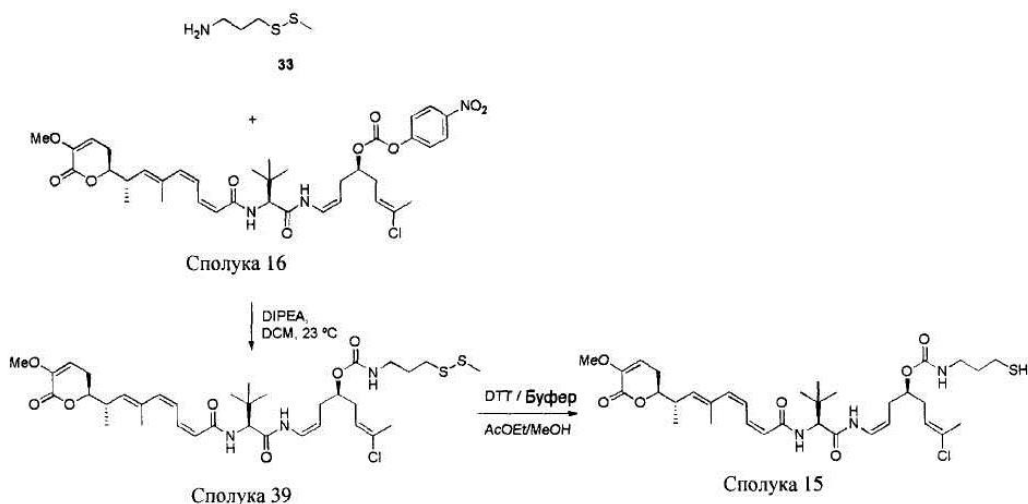
Одержання Сполуки 14

До розчину Сполуки 16 (60 мг, 0,08 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 5(а) вище, у CH_2Cl_2 (2 мл) додавали розчин Сполуки 38 (58 мг, 0,28 ммоль), одержаної, як описано для стадії (b) вище, і DIPEA (0,1 мл, 0,56 ммоль) у CH_2Cl_2 (2 мл). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 3 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою CH_2Cl_2 . Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc суміші) з одержанням чистої Сполуки 14 (60,5 мг, 95 %).

^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,88 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 7,29-7,24 (м, 1H), 6,90 (т, $J=11,5$ Гц, 1H), 6,82 (т, $J=9,1$ Гц, 1H), 6,63 (т, $J=6,1$ Гц, 1H), 6,49 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,16 (дд, $J=11,5, 1,5$ Гц, 1H), 5,70 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 5,68-5,51 (м, 3H), 5,29 (д, $J=9,7$ Гц, 1H), 4,81 (кв., $J=8,2$ Гц, 1H), 4,52 (д, $J=9,5$ Гц, 1H), 4,52-4,43 (м, 1H), 4,24 (ддд, $J=11,5, 7,3, 4,3$ Гц, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,37-3,21 (м, 3H), 3,21-3,12 (м, 1H), 2,97 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,90-2,81 (м, 1H), 2,60 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,49-2,35 (м, 3H), 2,39 (с, 3H), 2,33 (т, $J=7,0$ Гц, 2H), 2,14-2,07 (м, 1H), 2,07 (с, 3H), 1,84 (с, 3H), 1,73-1,64 (м, 2H), 1,16 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,05 (с, 9H).

^{13}C -ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 171,6, 168,2, 166,4, 161,6, 157,2, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 131,9, 124,4, 124,1, 122,4, 120,7, 108,3, 105,6, 81,8, 74,8, 60,6, 60,4, 55,5, 37,8, 37,2, 36,2, 35,6, 34,7, 33,1, 31,0, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 21,0, 17,2, 16,6.

Приклад 22. Альтернативний синтез Сполуки 15



(а) Одержання Сполуки 39

До розчину Сполуки 16 (178,7 мг, 0,25 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 5(а) вище, у CH_2Cl_2 (2,5 мл) додавали Сполуку 33 (120 мг, 0,88 ммоль), одержану, як описано в Прикладі 20(b) вище, і DIPEA (0,05 мл, 0,25 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 2 годин, розбавляли за допомогою H_2O і екстрагували за допомогою CH_2Cl_2 . Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc суміші) з одержанням чистої Сполуки 39 (100 мг, 56 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,65 (д, $J=10,7$ Гц, 1H), 7,28 (т, $J=11,6$ Гц, 1H), 6,90 (т, $J=11,5$ Гц, 1H), 6,82 (т, $J=9,6$ Гц, 1H), 6,37 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 6,17 (д, $J=11,7$ Гц, 1H), 5,69 (д, $J=11,4$ Гц, 1H), 5,64-5,57 (м, 2H), 5,34 (т, $J=6,2$ Гц, 1H), 5,29 (д, $J=10,0$ Гц, 1H), 4,81 (кв., $J=8,3$ Гц, 1H), 4,54-4,49 (м, 1H), 4,45 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 4,28-4,17 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 3,37-3,21 (м, 2H), 2,85 (дт, $J=9,7, 6,9$ Гц, 1H), 2,71 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,44-2,30 (м, 5H), 2,38 (с, 3H), 2,13-2,06 (м, 1H), 2,07 (с, 3H), 1,93 (п, $J=6,9$ Гц, 2H), 1,84 (с, 3H), 1,16 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 1,06 (с, 9H).

ESI-MS m/z : розраховано для $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}_2$: 725,9; знайдено: 748,3 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

(b) Одержання Сполуки 15

Розчин Сполуки 39 (90 мг, 0,12 ммоль), одержаної, як описано в Прикладі 5(а) вище, у суміші EtOAc (6,7 мл) і CH_3OH (6,7 мл) обробляли розчином дитіотреїтолу (0,36 мл, 0,36 ммоль) у 0,05М калійфосфатному буфері (6,7 мл) при pH 7,5, що містить 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Суміш перемішували при 23°C протягом 4 годин. Реакційну суміш обробляли розчином 0,2М калійфосфатного буфера при pH 6,0, що містить 2 мМ EDTA, і екстрагували за допомогою EtOAc ($\times 3$). Об'єднані органічні шари сушили над безводним Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі. Одержаний залишок очищали в системі для флеш-хроматографії (SiO_2 , Hex:EtOAc суміші) з одержанням чистої цільової Сполуки 15 (40,2 мг, 46 %).

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 8,66 (д, J=10,7 Гц, 1H), 7,29 (т, J=11,2 Гц, 1H), 6,91 (т, J=11,5 Гц, 1H), 6,83 (т, J=9,7 Гц, 1H), 6,38 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,17 (д, J=11,8 Гц, 1H), 5,70 (д, J=11,4 Гц, 1H), 5,65-5,51 (м, 2H), 5,34 (т, J=6,3 Гц, 1H), 5,29 (д, J=10,0 Гц, 1H), 4,82 (кв., J=8,3 Гц, 1H), 4,56-4,48 (м, 1H), 4,45 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,22 (ддд, J=11,4, 7,5, 4,3 Гц, 1H), 3,67 (с, 3H), 3,31 (кв., J=6,4 Гц, 2H), 2,88-2,83 (м, 1H), 2,55 (кв., J=7,7 Гц, 2H), 2,47-2,30 (м, 5H), 2,12-2,07 (м, 1H), 2,08 (с, 3H), 1,88-1,76 (м, 5H), 1,17 (д, J=6,6 Гц, 3H), 1,06 (с, 9H).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 168,2, 166,2, 161,5, 156,7, 145,2, 140,2, 137,3, 134,2, 134,0, 132,0, 124,4, 124,2, 122,3, 120,8, 108,1, 105,5, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 39,6, 37,3, 34,6, 33,9, 33,3, 30,8, 26,7, 26,3, 21,8, 21,1, 17,2, 16,7.

ESI-MS m/z: розраховано для C₃₄H₅₀ClN₃O₇S: 679,3; знайдено: 702,4 (M+Na)⁺.

Приклади, що демонструють цитотоксичність кон'югатів антитіло-лікарський засіб за даним винаходом

Біоаналізи для визначення протипухлинної активності

Метою цього аналізу було *in vitro* визначення цитостатичної (здатність уповільнювати або зупиняти ріст пухлинних клітин) або цитотоксичної (здатність убивати пухлинні клітини) активності випробовуваних зразків.

Клітинні лінії і клітинна культура

Усі пухлинні клітинні лінії, використовувані в цьому випробуванні, були одержані від American Type Culture Collection (ATCC), якщо не зазначене інше: BT-474 (ATCC HTB-20, дуктальна карцинома молочної залози), SK-BR-3 (ATCC HTB-30, аденокарцинома молочної залози) і HCC-1954 (ATCC CRL-2338, дуктальна карцинома молочної залози), усі HER2+; MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, аденокарцинома молочної залози) і MCF-7 (ATCC HTB-22, аденокарцинома молочної залози, плевральний випіт), усі HER2-; SK-OV-3 (ATCC HTB-77, аденокарцинома яєчників), HER2+; NB4 (гострий промієлоцитарний лейкоз, APL, CD13+, M. Lanotte et al. (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). Blood 77, 1080-1086), (CD13+) і U937 (ATCC CRL-1593,2, гістіоцитарна лімфома, CD13+ і CD4+); Raji (ATCC CCL-86, лімфома Беркитта) (CD13-, CD20+, CD5- і CD4-); RPMI-8226 (ATCC CRM-CCL-155, множинна мієлома) (CD13-, CD20-, CD5- і CD4-); Karpas-299 (DSMZ ACC-31, неходжкінська лімфома) (CD20-, CD5+ і CD4+); MOLT-4 (ATCC CRL-1582, гострий лімфобластний лейкоз, CD5+). Крім того, два Raji клітинних (ATCC CCL-86, лімфома Беркитта) клони використовували в цьому випробуванні: Raji-клон#10 (висока експресія CD5) і Raji-клон#18 (нульова експресія CD5), були одержані від Dr. Juan M. Zapata (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, Spain). Клітини підтримували при 37°C, 5 % CO₂ і 95 % вологості в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) (для клітин MCF і MDA-MB-231), RPMI-1640 (для клітин SK-BR-3, HCC-1954, NB4, U937, Raji, RPMI-8226, Karpas-299, MOLT-4, Raji-клон#10 і Raji-клон#18), RPMI-1640+1 % ITS (для клітин BT-474) або McCOyS (для клітин SK-OV-3), усі середовища були доповнені 10 % фетальною телячою сироваткою (FCS) і 100 Од./мл пеніциліну і стрептоміцину.

Аналіз цитотоксичності

Для адгезивних клітин: колориметричний аналіз з використанням сульфородаміну В (SRB) адаптували для кількісного визначення клітинного росту і цитотоксичності, як описано в Vichai V. і Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, 1, 1112-1116. Коротко, клітини висівали в 96-ямкові мікротитрувальні планшети і давали вистоятися протягом 24 годин у середовищі, що не містить лікарський засіб, перед обробкою тільки носієм або зазначеними сполуками протягом 72 годин. Для кількісного аналізу клітини промивали два рази фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS), фіксували протягом 15 хвилин у 1 % розчині глутаральдегіду, промивали два рази за допомогою PBS, забарвлювали в розчині 0,4 % SRB-1 % оцтової кислоти протягом 30 хвилин, промивали декілька разів 1 % розчином оцтової кислоти і сушили на повітрі. SRB потім екстрагували в 10 mM Trizma вихідному розчині й оптичну густину вимірювали при 490 нм у спектрофотометрі для мікропланшетів. Клітинне виживання виражали як відсоток від контролю, виживання необроблених клітин.

Для клітин у суспензії: стандартний метаболічний аналіз з використанням МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолійбромід) адаптували для кількісного визначення клітинного росту і цитотоксичності, як описано в Mosmann T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth., 65, 55-63. Коротко, МТТ-розчин додавали до клітинних культур при кінцевій концентрації 0,5 мг/мл і інкубували протягом 1-4 годин при 37°C аж до утворення кристалів формагану. Культуральне середовище обережно видаляли з клітинних культур і кристали формагану ресуспендували в 100 мл DMSO. Після перемішування протягом забезпечення солюбілізації кількість формагану

(передбачувано прямо пропорційна кількості життєздатних клітин) вимірювали шляхом реєстрації змін поглинальної здатності при 570 нм з використанням спектрофотометра для зчитування планшетів. Клітинне виживання виражали як відсоток від контролю, виживання необроблених клітин.

5 IC_{50} -значення стосується концентрації сполуки, що викликає 50 % клітинної загибелі в порівнянні з контрольним клітинним виживанням.

Приклад біоактивності 1. Цитотоксичність ADC1 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

10 *In vitro* цитотоксичність ADC1 поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1 і 4 і Трастузумабом оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, надекспресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи BT-474, HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER-негативні клітини). SK-OV-3, HER2+ клітинна лінія раку яєчника також була включена у випробування як модель, відмінна від поп-клітин тканини молочної залози. Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72

15 годин.
Цитотоксичність Трастузумабу

20 Насамперед, *in vitro* цитотоксичність Трастузумабу випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. В одержаних у трьох повторностях DR-кривих у діапазоні від $5,0E+01$ до $2,6E-05$ мкг/мл ($3,1E-07$ - $8,0E-11$ M), у двох незалежних експериментах, Трастузумаб був зовсім неактивним, не досягаючи значень IC_{50} у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу (див. Таблицю 3).

Таблиця 3

Узагальнені результати *in vitro* цитотоксичності Трастузумабу

Трастузумаб						
Клітини молочної залози						Клітини яєчників
HER2+			HER2-			HER2+
BT-474	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-OV-3	
IC_{50} (мкг/мл)	> $5,0E+01$	> $5,0E+01$	> $5,0E+01$	> $5,0E+01$	> $5,0E+01$	> $5,0E+01$
IC_{50} (молярний)	> $3,44E-07$	> $3,44E-07$	> $3,44E-07$	> $3,44E-07$	> $3,44E-07$	> $3,44E-07$

Цитотоксичність Сполуки 4

25 Цитотоксичність проміжної Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень ($1/2,5$ відношення) від $1E-01$ до $2,6E-05$ мкг/мл ($1,5E-07$ до $3,9E-11$ M).

30 Цитотоксичність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від $8,9E-05$ до $1,7E-03$ мкг/мл ($1,34E-10$ до $2,6E-09$ M), із середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $5,69E-04$ мкг/мл ($8,57E-10$ M). Крім того, цитотоксичність Сполуки 4 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (див. Таблицю 4).

Таблиця 4

Узагальнені результати *in vitro* цитотоксичності Сполуки 4

Сполука 4						
Клітини молочної залози						Клітини яєчників
HER2+			HER2-			HER2+
BT-474	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-OV-3	
IC_{50} (мкг/мл)	$1,74E-03$	$1,30E-04$	$8,90E-05$	$4,15E-04$	$3,10E-04$	$7,30E-04$
IC_{50} (молярний)	$2,62E-09$	$1,96E-10$	$1,34E-10$	$6,26E-10$	$4,68E-10$	$1,10E-09$

Цитотоксичність Сполуки 1

Активність вихідної Сполуки 1 випробували з використанням таких же умов, що описані вище, від $1\text{E-}01$ до $2,6\text{E-}05$ мкг/мл ($1,1\text{E-}07$ до $3,0\text{E-}11$ М). Цитотоксичність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, також була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від $8,9\text{E-}04$ до $6,4\text{E-}03$ мкг/мл ($1,04\text{E-}09$ до $7,47\text{E-}09$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $3,41\text{E-}03$ мкг/мл ($3,98\text{E-}09$ М). Малеїмідний лінкер, очевидно, трохи знижував цитотоксичний ефект сполуки. У цьому випадку також цитотоксичність Сполуки 1 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (див. Таблицю 5).

Таблиця 5

Узагальнені результати in vitro цитотоксичності Сполуки 1

	Сполука 1					
	Клітини молочної залози					Клітини яєчників
	HER2+			HER2-		HER2+
	BT-474	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-OV-3
IC_{50} (мкг/мл)	$6,40\text{E-}03$	$9,60\text{E-}04$	$8,90\text{E-}04$	$3,70\text{E-}03$	$2,80\text{E-}03$	$5,70\text{E-}03$
IC_{50} (молярний)	$7,47\text{E-}09$	$1,12\text{E-}09$	$1,04\text{E-}09$	$4,32\text{E-}09$	$3,27\text{E-}09$	$6,66\text{E-}09$

Цитотоксичність ADC1

Цитотоксичність ADC1 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат аналізували в шести різних одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, $1/2,5$ відношення), виходячи з 50, 10, 1, 0,1, 0,01 і 0,001 мкг/мл (еквівалентно $3,3\text{E-}07$, $6,6\text{E-}08$, $6,6\text{E-}09$, $6,6\text{E-}10$, $6,6\text{E-}11$ і $6,6\text{E-}12$ молярній концентрації), у двох незалежних експериментах.

Репрезентативна DR-крива представлена на фіг. 3.

Після коректування різних DR-кривих, одержували середнє IC_{50} -значення, розраховане для ADC1 проти різних клітинних ліній, що представлено в Таблиці 6 нижче. ADC1 показав цитотоксичність, порівнянну з цитотоксичністю вихідної Сполуки 1, використовуваної окремо, і, що важливо, чітку специфічність проти HER2+ експресуючих клітин. Тому вважають, що кон'югат дійсно діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню. Між HER2-позитивними клітинними лініями були суттєві відмінності в чутливості до ADC1. Найбільш чутливими клітинними лініями були HCC-1954 і SK-BR-3, що демонструють значення IC_{50} $3,88\text{E-}02$ і $2,45\text{E-}02$ мкг/мл (еквівалентно $2,581\text{E-}10$ і $1,63\text{E-}10$ М), потім клітини BT-474, що показали значно більш високе IC_{50} -значення $7,4\text{E-}01$ мкг/мл (еквівалентно $4,93\text{E-}09$ М). Оваріальна клітинна лінія SK-OV-3 показала ще більш високе IC_{50} -значення $7,0\text{E+}00$ мкг/мл (еквівалентно $4,67\text{E-}08$ М). Дві HER-негативні клітини показали однакову чутливість порядку $2,0\text{E+}01$ мкг/мл (еквівалентно приблизно $1,0\text{E-}07$ М) (див. Таблицю 6).

Таблиця 6

Узагальнені результати in vitro цитотоксичності ADC1

Клітинна лінія	Сполука ADC1					
	Клітини молочної залози					Клітини яєчників
	HER2+			HER2-		HER2+
HER2-статус	BT-474	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-OV-3
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,40E-01	3,88E-02	2,45E-02	1,20E+01	2,00E+01	7,00E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини (молочна залоза)						2,68E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини (молочна залоза)						1,60E+01
IC ₅₀ (M)	4,93E-09	2,58E-10	1,63E-10	7,97E-08	1,33E-07	4,67E-08
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-позитивні клітини (молочна залоза)						1,79E-09
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-негативні клітини (молочна залоза)						1,07E-07

Таким чином, найбільш чутливі HER2-позитивні клітини були приблизно в 300-800 разів більш чутливими, ніж HER2-негативні клітинні лінії, указуючи на специфічність кон'югата проти HER2 експресуючих клітин.

Для графічного порівняння цитотоксичності mAb Трастузумабу, використовованого окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC1, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC при 10 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 4. Як можна бачити з фіг. 4, при однаковій концентрації 10 мкг/мл, mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, показав незначну або взагалі ніякої цитотоксичності (<20 % max) проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC1 показав сильну цитотоксичність проти HER2-експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, і в меншому ступені BT-474 і SK-OV-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 88 %, 82 %, 52 % і 47 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC1 показав деяку цитотоксичність проти HER-негативних клітин MCF-7 і MDA-MB-231, з середніми з процентними значеннями інгібування клітинного виживання 38 % і 32 %, відповідно. При концентрації 1 мкг/мл, ADC1-кон'югат показав досить схожу цитотоксичність проти HER2-позитивних клітин з тією, котру спостерігали при 10 мкг/мл, але в цьому випадку без помітних ефектів на HER2-негативні клітини (фіг. 4).

Ці результати наочно демонструють чудову цитотоксичність і специфічність ADC1 кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 2. Цитотоксичність ADC2 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичність ADC2, Трастузумаб-Сполука 5 ADC, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 5 і 8 і mAb Трастузумабом оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 8

Цитотоксичність проміжної Сполуки 8 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,6E-06 до 4,0E-10 M).

Цитотоксичність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 3,40E-03 до 6,75E-03 мкг/мл (5,4E-09 до 1,0E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 5,53E-03 мкг/мл (еквівалентно 8,79E-09 M). Крім того, цитотоксичність Сполуки 8 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 7).

Таблиця 7

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 8

	Сполука 8			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	5,40E-03	3,40E-03	6,75E-03	6,55E-03
IC ₅₀ (молярний)	8,59E-09	5,41E-09	1,07E-08	1,04E-08

Цитотоксичність Сполуки 5

Активність Сполуки 5, модифікована Сполука 8, що містить малеїмідний лінкер, випробували в таких же умовах, що описані вище, від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,2E-06 до 3,1E-10 M).

Цитотоксичність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, також була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 1,9E-02 до 7,7E-02 мкг/мл (2,32E-08 до 9,41E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 4,33E-02 мкг/мл (5,26E-08 M). Присутність малеїмідного лінкера в Сполуці 5 злегка знижувала цитотоксичність цієї сполуки в порівнянні зі Сполукою 8. Також, цитотоксичність Сполуки 5, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 8).

Таблиця 8

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 5

	Сполука 5			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,95E-02	1,90E-02	7,75E-02	5,70E-02
IC ₅₀ (молярний)	2,38E-08	2,32E-08	9,41E-08	6,94E-08

Цитотоксичність ADC2

Цитотоксичну активність ADC2 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в п'ятих різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1, 0,1, і 0,01 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива представлена на фіг. 5. Одержані після коректування всіх різних DR-кривих, середні IC₅₀-значення, розраховані для ADC2 проти різних клітинних ліній, показані в Таблиці 9. Кон'югат ADC2 показав специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, у яких сполука продемонструвала цитотоксичність, подібну цитотоксичності вихідної Сполуки 5, з середніми IC₅₀-значеннями 5,8E+00 і 2,2E-01 мкг/мл (еквівалентно 4,0E-08 і 1,5E-09 M), відповідно. Дві HER- клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, були фактично несприйнятливими до ADC2 у випробовуваному діапазоні концентрацій, не досягаючи IC₅₀-значення (>5,0E+01 мкг/мл) (див. фіг. 5 і Таблицю 9).

Тому вважають, що кон'югат дійсно діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Таблиця 9

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC2 (Трастузумаб-Сполука 5 ADC)

	ADC2 (Трастузумаб-Сполука 5 ADC)			
Клітинна лінія	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
HER2-статус	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	5,80E+00	2,20E-01	>5,0E+01	>5,0E+01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				3,01E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				>5,0E+01
IC ₅₀ (M)	4,00E-08	1,52E-09	>3,4E-07	>3,4E-07
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-позитивні клітини				2,08E-08
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-негативні клітини				>3,4E-07

Для графічного порівняння цитотоксичності Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC2, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній тільки одним Трастузумабом (10 мкг/мл) або ADC при 10 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 6. При концентрації 10 мкг/мл, mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, не показав ніякої цитотоксичності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC2-кон'югат продемонстрував значну і специфічну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин HCC-1954 і SK-BR-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 57 % і 78 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами.

При концентрації 1 мкг/мл, ADC2-кон'югат показав досить схожу цитотоксичність проти HER2-позитивних клітин з тією, котру спостерігали при 10 мкг/мл, у цьому випадку також без помітних ефектів на HER2-негативні клітини (фіг. 6).

Ці результати наочно демонструють чудову цитотоксичність і специфічність ADC2-кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 3. Цитотоксичність ADC3 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичність ADC3, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 12 і 4 і mAb Трастузумабом, оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичність вихідної Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-07 до 3,9E-12 M).

Цитотоксичність Сполуки 4, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в пікомолярному діапазоні, від 1,16E-04 до 2,80E-04 мкг/мл (1,75E-10 до 4,23E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,97E-04 мкг/мл (еквівалентно 2,96E-10 M). Крім того, цитотоксичність Сполуки 4 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 10).

Таблиця 10

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,20E-04	1,16E-04	2,80E-04	2,70E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,81E-10	1,75E-10	4,321E-10	4,07E-10

Цитотоксичність Сполуки 12

5 Активність Сполуки 12, модифікована Сполука 4, що містить розщеплюваний пептидний лінкер, випробували в таких же експериментальних умовах, що описані вище, у діапазоні концентрацій від 01E+01 до 2,6E-03 мкг/мл (7,9E-06 до 2,0E-09 M).

10 Цитотоксичність Сполуки 12 у двох незалежних експериментах також була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 7,60E-03 до 3,05E-02 мкг/мл (6,02E-09 до 2,42E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,63E-02 мкг/мл (1,29E-08 M) (Таблиця 11). Присутність пептидного лінкера в Сполуці 12 мала негативний ефект на цитотоксичність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 4. Цитотоксичність Сполуки 12 була досить незалежною від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній.

Таблиця 11

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 12

	Сполука 12			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,60E-03	9,05E-03	3,05E-02	1,80E-02
IC ₅₀ (молярний)	6,02E-09	7,18E-09	2,42E-08	1,43E-08

Цитотоксичність ADC 3

15 На завершення, цитотоксичність ADC3 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в шести різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1, 0,1, 0,01 і 0,001 мкг/мл (еквівалентно 3,33E-07, 6,64E-08, 6,64E-09, 6,64E-10, 6,64E-11 і 6,64E-12 молярній концентрації), у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива представлена на фіг. 7. Середні IC₅₀-значення, розраховані для ADC3 проти різних випробовуваних клітинних ліній, показані в Таблиці 12.

20 Кон'югат ADC3 зовсім ясно показав суттєву специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, у яких сполука продемонструвала сильну цитотоксичність, подібну цитотоксичності вихідної Сполуки 4 (приблизно 1 log більш активна, ніж проміжна Сполука 12, що містить пептидний лінкер). Обидві HER2+ клітинні лінії, HCC-1954 і SK-BR-3, показали порівнянну чутливість проти ADC3, з середніми IC₅₀-значеннями 8,83E-02 і 6,77 E-02 мкг/мл (еквівалентно 5,86E-10 і 4,49E-10 M), відповідно. Дві HER-негативні клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, показали суттєво більш низьку чутливість проти ADC3, з середніми IC₅₀-значеннями 9,40E+00 і >5,0E+01 мкг/мл (еквівалентно приблизно 6,24E-08 M і >3,32E-07 M), відповідно.

30 Фіг. 8 представляє графік цитотоксичності ADC3 проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози. Було виявлено, що HER2+ клітинні лінії (середнє значення IC₅₀ 7,80E-02 мкг/мл) були щонайменше в >120 разів більш чутливими до ADC3, ніж HER2-негативні клітини MCF-7 (середнє значення IC₅₀ 9,40E+00 мкг/мл), і набагато більш чутливими, ніж клітини MDA-MB-231, зовсім ясно демонструючи специфічність ADC3 проти HER2 експресуючих клітин (фіг. 7 і Таблиця 12). Тому вважають, що кон'югат дійсно діяв через взаємодію mAb з

мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Таблиця 12

Узагальнені дані *in vitro* цитотоксичності ADC3 (Трастузумаб-Сполука 12)

ADC3 (Трастузумаб-Сполука 12 ADC)				
Клітинна лінія	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
HER2-статус	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	8,83E-02	6,77E-02	9,40E+00	>5,0E+01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				7,80E-02
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				9,40E+00
IC ₅₀ (M)	5,86E-10	4,49E-10	6,24E-08	>3,32E-07
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-позитивні клітини				5,18E-10
Середнє значення IC ₅₀ (M) HER2-негативні клітини				6,24E-08

5 Для графічного порівняння цитотоксичності mAb Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC3, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC3 при 10 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 8, що показує цитотоксичну активність Трастузумабу як ADC3 проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини.

10 При однаковій концентрації 10 мкг/мл, Трастузумаб, використовуваний окремо, не показав ніякої цитотоксичності ні проти однієї з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC3-кон'югат показав сильну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3. У цих клітинних лініях, ADC3 продемонстрував інгібування клітинного виживання 83 % і 84 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC3 також надавав деяку дію на HER2-негативні клітини, MCF-7 і MDA-MB-231, забезпечуючи невелике інгібування клітинного виживання 33 % і 20 %, відповідно. При концентрації 1 мкг/мл, ADC3-кон'югат показав таку ж цитотоксичність проти HER2-позитивних клітин, яку спостерігали при 10 мкг/мл, але без помітних ефектів на HER2-негативні клітини (фіг. 8). Ці результати наочно демонструють чудову цитотоксичність і специфічність ADC3 проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини *in vitro*.

20 Приклад біоактивності 4. Цитотоксичність ADC4 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

15 *In vitro* цитотоксичність ADC4, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 13 і 4 і mAb Трастузумабом, оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER2-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 4

30 Цитотоксичність вихідної Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 1E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,5E-07 до 3,0E-11 M).

35 Цитотоксичність Сполуки 4, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 2,43E-04 до 4,45E-04 мкг/мл (3,6E-10 до 6,7E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цілюноклітинних аналізів 3,3E-04 мкг/мл (еквівалентно 4,98E-10 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 4 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 13).

Таблиця 13

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл) (мкг/мл)	2,98E-04	2,43E-04	4,45E-04	3,35E-04
IC ₅₀ (молярний)	4,49E-10	3,66E-10	6,71E-10	5,05E-10

Цитотоксичність Сполуки 13

5 Активність Сполуки 13, модифікована Сполука 4 з тіолвмісною групою, випробували в таких же умовах, що описані вище, від 1E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,3E-07 до 2,0E-11 M).

10 Цитотоксична активність Сполуки 13, у двох незалежних експериментах, також була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 7,95E-04 до 2,63E-03 мкг/мл (1,0E-09 до 3,5E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,83E-03 мкг/мл (2,44E-09 M) (Таблиця 14).
 Присутність тіолвмісної кінцевої групи у Сполучі 13 злегка знижувала (приблизно в 5 разів) цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 4. Також, цитотоксичність Сполуки 13, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 14).

Таблиця 14

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 13

	Сполука 13			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,49E-03	7,95E-04	2,43E-03	2,63E-03
IC ₅₀ (молярний)	1,98E-09	1,06E-09	3,23E-09	3,50E-09

15 Цитотоксичність ADC4

20 Цитотоксичність ADC4 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах.
 Репрезентативна DR-крива представлена на фіг. 9. Після коректування всіх різних DR-кривих, середні IC₅₀-значення, розраховані для ADC4 проти різних випробовуваних клітинних ліній, показані в Таблиці 15.

25 Кон'югат ADC4 показав специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, у яких сполука продемонструвала сильну цитотоксичність, подібну цитотоксичності вихідних Сполук 4 і 13, з середніми IC₅₀-значеннями 1,17E-01 і 4,80E-02 мкг/мл, відповідно. Дві HER-негативні клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, показали значно більш низьку чутливість проти ADC4, з середніми IC₅₀-значеннями 5,35E+00 і 6,50E+00 мкг/мл, відповідно. Очевидно, кон'югат переважно діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в
 30 тканину, що є мішенню.

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC4

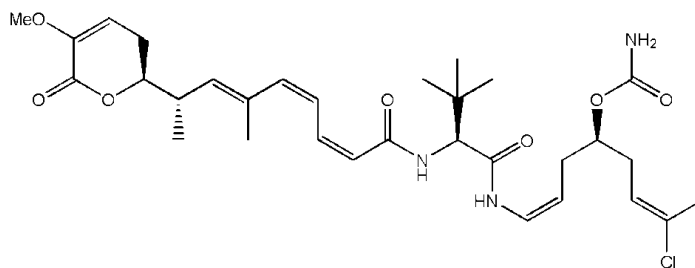
	ADC 4			
HER2-статус	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,17E-01	4,80E-02	5,35E+00	6,50E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				8,24E-02
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				5,93E+00

Для графічного порівняння цитотоксичності mAb Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC4, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC4 при 10 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 10. При концентрації 10 мкг/мл, mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, не показав ніякої цитотоксичності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC4-кон'югат продемонстрував значну і специфічну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 80 % і 75 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC4 також надавав дію на HER2-негативні клітини, MCF-7 і MDA-MB-231, викликаючи інгібування клітинного виживання 53 % і 40 %, відповідно. При концентрації 1 мкг/мл, ADC4-кон'югат показав досить схожу цитотоксичність проти HER2-позитивних клітин з тією, котру спостерігали при 10 мкг/мл, але без помітних ефектів на HER2-негативні клітини (фіг. 10). Ці результати наочно демонструють чудову цитотоксичність і специфічність ADC4-кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 5. Цитотоксичність ADC5 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичність ADC5, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 15 і 28, оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER-негативні клітини).

Цитотоксичність Сполуки 40



40

Сполука 40 була одержана, як описано в WO 2007144423 (Сполука 1 у цій патентній заявці), зміст якої включений в дану заявку за допомогою посилання.

Цитотоксичність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 1E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,65E-08 до 4,29E-12 M).

Цитотоксичність Сполуки 40, у двох незалежних експериментах, була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 4,90E-05 до 1,73E-04 мкг/мл (8,10E-11 до 2,84E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,06E-04 мкг/мл (еквівалентно 1,75E-10 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 16).

Таблиця 16

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,05E-05	4,90E-05	1,32E-04	1,73E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,16E-10	8,10E-11	2,18E-10	2,84E-10

Цитотоксичність Сполуки 15

Активність Сполуки 15, модифікована Сполука 40 з тіолвмісною групою, випробовували в таких же умовах, що описані вище, від 1E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,47E-07 до 3,82E-11 M).

- 5 Цитотоксичність Сполуки 15, у двох незалежних експериментах, також була досить гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 4,80E-04 до 1,49E-03 мкг/мл (7,06E-10 до 2,19E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цілюноклітинних аналізів 1,03E-03 мкг/мл (1,51E-09 M). Присутність тіолвмісної кінцевої групи у Сполучі 15 злегка знижувала (приблизно в 8 разів) цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполучою 40. Також, цитотоксичність Сполуки 15 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 17).

Таблиця 17

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 15

	Сполука 15			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	6,75E-04	4,80E-04	1,45E-03	1,49E-03
IC ₅₀ (молярний)	9,94E-10	7,06E-10	2,14E-09	2,19E-09

Цитотоксичність ADC5

- 15 Цитотоксичність ADC5 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 11. Після коректування всіх різних DR-кривих, середні IC₅₀-значення, розраховані для ADC5 проти різних випробовуваних клітинних ліній, показані в Таблиці 18.

- 20 Кон'югат ADC5 показав специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, подібну активності вихідних сполук, Сполуки 28 і Сполуки 15, з середніми IC₅₀-значеннями 1,13E-01 і 4,61E-02 мкг/мл, відповідно. Дві HER-негативні клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, показали суттєво більш низьку чутливість проти ADC5, з середніми IC₅₀-значеннями 1,23E+00 і 1,45E+00 мкг/мл, відповідно.

- 25 Очевидно, кон'югат ADC5 переважно діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

30

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC5

	ADC5			
HER2-статус	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,13E-01	4,61E-02	1,23E-02	1,45E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				7,96E-02
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				1,34E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC5, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC5 при 10 мкг/мл або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 12. При концентрації 10 мкг/мл mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, не показав ніякої цитотоксичної активності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC5-кон'югат продемонстрував значну і специфічну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 82 % і 72 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC5 також надавав дію на HER2-негативні клітини, MCF-7 і MDA-MB-231, викликаючи інгібування клітинного виживання 58 % і 54 %, відповідно. При концентрації 1 мкг/мл, ADC5-кон'югат показав цитотоксичну активність проти HER2-позитивних клітин, приблизно аналогічну тій, котру спостерігали при 10 мкг/мл (77 % і 75 %, відповідно), але значно більш низьку активність проти HER2-негативних клітин, з інгібуванням клітинного виживання 24 % і 15 %, відповідно (фіг. 12). Ці результати продемонстрували чудову цитотоксичну активність і відносну специфічність ADC5-кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 6. Цитотоксичність ADC6 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичність ADC6 поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 18 і 8 оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER2-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для декількох годин.

Цитотоксичність Сполуки 8

Цитотоксичність вихідної сполуки 8 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 1E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,59E-06 до 4,13E-10 M). Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях (трохи більш висока активність проти клітин SK-BR-3), з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 1,85E-03 до 9,50E-03 мкг/мл (2,94E-09 до 1,51 E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 5,45E-03 мкг/мл (еквівалентно 8,67E-09 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 8, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 19).

Таблиця 19

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 8

	Сполука 8			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	5,20E-03	1,85E-03	9,50E-03	5,25E-03
IC ₅₀ (молярний)	8,27E-09	2,94E-09	1,51E-08	8,35E-09

Цитотоксичність Сполуки 18

Активність Сполуки 18, модифікована Сполука 8 з тіолвмісною групою, випробували в таких же умовах, що описані вище, від $1\text{E}+00$ до $2,6\text{E}-04$ мкг/мл ($1,39\text{E}-06$ до $3,63\text{E}-10$ М). Цитотоксичність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, також була досить гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в наномолярному діапазоні, від $4,40\text{E}-03$ до $1,85\text{E}-02$ мкг/мл ($6,14\text{E}-09$ до $2,58\text{E}-08$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $1,06\text{E}-02$ мкг/мл ($1,48\text{E}-08$ М). Присутність тіолвмісної кінцевої групи у Сполуці 18 надавала незначний ефект на активність сполуки, у порівнянні зі Сполучкою 8. Також, цитотоксичність Сполуки 18, очевидно, була в достатньому ступені незалежною від HER2-статусу пухлинної клітинної лінії (Таблиця 20).

Таблиця 20

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 18

Сполука 18				
Клітини молочної залози				
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC_{50} (мкг/мл)	8,05E-03	4,40E-03	1,85E-02	1,15E-02
IC_{50} (молярний)	1,12E-08	6,14E-09	2,58E-08	1,60E-08

Цитотоксичність ADC6

Цитотоксичність ADC6 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, $1/2,5$ відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна крива DR представлена на фіг. 13. Після коректування всіх різних DR-кривих, середні IC_{50} -значення, розраховані для ADC6 проти різних випробовуваних клітинних ліній, показані в Таблиці 21.

Кон'югат ADC6 показав деяку специфічність, хоча й обмежену, відносно HER2+ експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3. У цих клітинних лініях, кон'югат були трохи менш цитотоксичним, ніж вихідні Сполуки 8 і 18 окремо (у 5,6 і 3,2 разів, відповідно), з середніми IC_{50} -значеннями $1,04\text{E}+01$ і $3,80\text{E}+00$ мкг/мл, відповідно. Дві HER-негативні клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, показали трохи більш низьку чутливість проти ADC6 (у 5 разів менше), з середніми IC_{50} -значеннями $3,50\text{E}+01$ і $4,40\text{E}+01$ мкг/мл, відповідно. Очевидно, кон'югат ADC6 надавав деяку переважну дію на HER2 експресуючі клітини, діючи через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Таблиця 21

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC6

ADC6				
HER2-статус	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC_{50} (мкг/мл)	1,04E+01	3,80E+00	3,50E+01	4,40E+01
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				7,12E+00
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) HER2-негативні клітини				3,95E+01

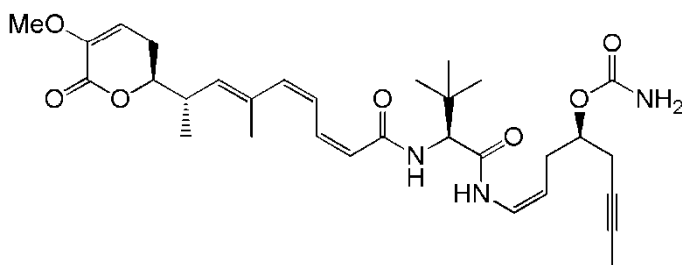
Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC6, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (10 мкг/мл) або ADC6 при 10 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 14. При концентрації 10 мкг/мл, mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, не продемонстрував ніякої цитотоксичної активності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC6-кон'югат

показав специфічну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 57 % і 70 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC6 також мав залишковий ефект на HER2-негативні клітини, MCF-7 і MDA-MB-231, викликаючи інгібування клітинного виживання 9 % і 7 %, відповідно. При концентрації 1 мкг/мл, ADC6-кон'югат все ж мав цитотоксичну активність проти HER2-позитивних клітин, хоча і менше тієї, котру спостерігали при 10 мкг/мл (19 % і 38 %, відповідно). При цій концентрації, ADC6 був зовсім неактивним проти HER2-негативних клітин (фіг. 14). Ці результати продемонстрували переважну цитотоксичну активність ADC6-кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини *in vitro*.

Приклад біоактивності 7. Цитотоксичність ADC7 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичність ADC7 поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 24, 25 і 41 оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER2-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 41



41

Сполука 41 була одержана, як описано в WO 2009/080761 (Сполука 72 у цій патентній заявці), зміст якої включений в дану заяву за допомогою посилання.

Цитотоксичність вихідної Сполуки 41 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 1E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,8E-08 до 4,6E-12 M). Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 1,0E-04 до 2,6E-04 мкг/мл (1,8E-10 до 4,6E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,6E-04 мкг/мл (еквівалентно 2,9E-10 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 41 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 22).

Таблиця 22

Узагальнені дані *in vitro* цитотоксичності Сполуки 41

	Сполука 41			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,04E-04	1,10E-04	2,65E-04	1,80E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,83E-10	1,93E-10	4,65E-10	3,16E-10

Цитотоксичність Сполуки 24

Активність Сполуки 24 випробували в таких же умовах, які описані вище, від 1E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,6E-06 до 4,1E-10 M). Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 9,0E-03 до 1,8E-02 мкг/мл (1,4E-08 до 2,8E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,5E-02 мкг/мл (2,4E-08 M). Присутність 1,3-пропілендіамінової групи в Сполуці 24 суттєво знижувала (приблизно 2 log) цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 41. Також, цитотоксичність Сполуки 24, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 23).

Таблиця 23

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 24

	Сполука 24			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,80E-02	9,00E-03	1,65E-02	1,75E-02
IC ₅₀ (молярний)	2,87E-08	1,44E-08	2,63E-08	2,79E-08

Цитотоксичність Сполуки 25

- Активність Сполуки 25, модифікована Сполука 24, що містить MC-лінкер, випробували в таких же умовах, що описані вище, від 1E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,2E-07 до 3,2E-11 M).
- 5 Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 2,5E-02 до 5,3E-02 мкг/мл (3,1E-08 до 6,5E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 4,1E-02 мкг/мл (4,9E-08 M). Присутність MC-лінкера в Сполучі 25 дуже незначно знижувала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполучкою 24, особливо в клітинах MDA-MB-231. Цитотоксичність Сполуки 25, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 24).
- 10

Таблиця 24

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 25

	Сполука 25			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	4,40E-02	2,55E-02	5,30E-02	>1,0E-01
IC ₅₀ (молярний)	5,37E-08	3,11E-08	6,46E-08	>1,22E-07

Цитотоксичність ADC7

- Цитотоксичність ADC7 випробували проти різних клітинних ліній. Для забезпечення придатного діапазону концентрацій, кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 10 мкг/мл) представлена на фіг. 15. Після коректування всіх різних DR-кривих, середні IC₅₀-значення, розраховані для ADC7 проти різних
- 15 випробовуваних клітинних ліній, показані в Таблиці 25.
- 20 Кон'югат ADC7 показав специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, дуже схожу з активністю вихідної сполуки 29, з середніми IC₅₀-значеннями 3,7E-01 і 8,9E-02 мкг/мл, відповідно. Дві HER-негативні клітинні лінії, MCF-7 і MDA-MB-231, були фактично несприйнятливими до ADC7. Кон'югат,
- 25 очевидно, діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним HER2-рецептором на позитивних пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Таблиця 25

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC7

ADC7				
HER2-статус				
	HER2+		HER2-	
Клітинна лінія	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	3,75E-01	8,97E-02	>5,0E+01	>5,0E+01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				2,32E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				>5,0E+01

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Трастузумабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC7, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC7 при 50 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 16. При концентрації 50 мкг/мл, mAb Трастузумаб, використовуваний окремо, не показав ніякої значимої цитотоксичної активності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх HER2-статусу. З іншого боку, ADC7-кон'югат продемонстрував значну і специфічну цитотоксичність проти HER2 експресуючих клітин, HCC-1954 і SK-BR-3, індукуючи середнє інгібування клітинного виживання 77 % і 76 %, відповідно, у порівнянні з контрольними клітинами. При цій концентрації, ADC7 мав лише залишковий ефект на HER2-негативні клітини, MCF-7 і MDA-MB-231, викликаючи інгібування клітинного виживання 13 % і 15 %, відповідно. Подібну активність і специфічність визначали при більш низьких концентраціях ADC7 (таких як 1 мкг/мл) у клітинах HCC-1954 і SK-BR-3, що викликає інгібування клітинного виживання 68 % і 79 %, відповідно (фіг. 16). Узяті разом, ці результати наочно демонструють чудову цитотоксичну активність і специфічність ADC7-кон'югата проти HER2 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 8. Цитотоксичність ADC8 і відповідних реагентів проти HER2-позитивних і негативних клітин раку молочної залози

In vitro цитотоксичну активність ADC8, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 24, 27 і 41, оцінювали проти різних клітинних ліній раку молочної залози людини, експресуючих або не експресуючих HER2-рецептор, включаючи HCC-1954 і SK-BR-3 (HER2-позитивні клітини) і MDA-MB-231 і MCF-7 (HER-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 41

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 41 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,8E-08 до 4,6E-12 M). Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 7,25E-05 до 1,4E-04 мкг/мл (1,3E-10 до 2,4E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,1E-04 мкг/мл (еквівалентно 1,9E-10 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 41 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 26).

Таблиця 26

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 41

Сполука 41				
Клітини молочної залози				
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,55E-05	8,05E-05	1,39E-04	1,35E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,33E-10	1,41E-10	2,44E-10	2,36E-10

Цитотоксичність Сполуки 24

- Активність Сполуки 24 (випробували в таких же умовах, що описані вище, від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,6E-06 до 4,1E-10 M)). Цитотоксична активність цієї сполуки, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 9,0E-03 до 1,8E-02 мкг/мл (1,4E-08 до 2,9E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,5E-02 мкг/мл (2,4E-08 M). Присутність 1,3-пропілендіамінової групи в Сполуці 24 суттєво знижувала (приблизно 2 log) цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 41. Цитотоксичність Сполуки 24, очевидно, не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 27).

Таблиця 27

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 24

	Сполука 24			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,80E-02	9,00E-03	1,65E-02	1,75E-02
IC ₅₀ (молярний)	2,87E-08	1,44E-08	2,63E-08	2,79E-08

Цитотоксичність Сполуки 27

Активність Сполуки 27 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (1,4E-06 до 3,6E-10 M). Цитотоксична активність Сполуки 27, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в мікромолярному діапазоні, від 1,05E-02 до 3,9E-02 мкг/мл (1,5E-08 до 5,5E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 2,5E-02 мкг/мл (3,5E-08 M). Присутність МРА-лінкера в Сполуці 27 не мала ніякого значного ефекту на цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 24. Активність Сполуки 27 не залежала від HER2-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 28).

Таблиця 28

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 27

	Сполука 27			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,65E-02	1,05E-02	3,90E-02	3,45E-02
IC ₅₀ (молярний)	2,31E-08	1,47E-08	5,46E-08	4,83E-08

Цитотоксичність ADC8

Цитотоксичну активність ADC8 випробували проти різних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (максимальна концентрація 10 мкг/мл) представлена на фіг. 17. ADC8 показав деяку специфічність проти HER2+ експресуючих клітин, особливо в SK-BR-3, найбільш чутливій клітинній лінії. За винятком цих клітин, що приблизно в 4 рази більш чутливі, ніж HER2-негативні клітини (IC₅₀ 2,3E-09M), ADC8 показав подібну цитотоксичну активність, HER2-незалежну, як у вихідної сполуки 27, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні (Таблиця 29).

Таблиця 29

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC8

	ADC8			
	Клітини молочної залози			
	HER2+		HER2-	
	HCC-1954	SK-BR-3	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ (мкг/мл)	3,83E+00	6,37E-01	7,75E+00	1,02E+01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-позитивні клітини				2,23E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) HER2-негативні клітини				8,98E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Трастузумабу, використовуюваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC8, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC8 (50 або 10 мкг/мл), представлені на фіг. 18. При 50 мкг/мл, mAb окремо не показав ніякої активності в будь-якій з випробовуваних клітинних ліній, за винятком SK-BR-3, у якій він викликав інгібування клітинного виживання менше ніж 20 %. ADC8, у свою чергу, не показав ніякої значимої специфічності відносно HER2+ клітинних ліній, викликаючи сильне інгібування клітинного виживання більше ніж 60 % у всіх аналізованих клітинах. При концентрації 10 мкг/мл, ADC8 показав деяку, але незначну, специфічність проти клітин HER2+, викликаючи 78 % інгібування клітинного виживання в клітинах HCC-1954 і SK-BR-3, обидві HER2-позитивні, при цьому він мав менший ефект на HER2-негативні клітини, 59 % і 41 %, у MCF-7 і MDA-MB-231, відповідно. HER2-позитивні клітини були приблизно в 1,5-2 рази більш чутливими до ADC8, ніж HER2-негативні клітини.

Приклад біоактивності 9. Цитотоксичність ADC9 і відповідних реагентів проти CD13-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC9, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1 і 4, оцінювали проти різних пухлинних клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD13-рецептор, включаючи NB4 і U937 (CD13-позитивні клітини) і Raji і RPMI-8226 (CD13-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність анти-CD13 мишачого моноклонального антитіла

Насамперед, in vitro цитотоксичну активність анти-CD13 мишачого mAb окремо випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. В одержаних у трьох повторностях DR-кривих у діапазоні від 5,0E+01 до 1,3E-02 мкг/мл (3,3E-07-8,7E-11 M), у двох незалежних експериментах, антитіло було фактично неактивним, не досягаючи значень IC₅₀ у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD13-статусу (Таблиця 30).

Таблиця 30

Узагальнені дані in vitro цитотоксичної активності анти-CD13 мишачого mAb

	анти-CD13 мишаче mAb			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
IC ₅₀ (молярний)	>3,33E-07	>3,33E-07	>3,33E-07	>3,33E-07

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4, у двох незалежних експериментах, була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 7,9E-05 до 2,65E-03 мкг/мл (1,2E-10 до 4,0E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 8,4E-04 мкг/мл (еквівалентно 1,2E-09 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 4 була досить незалежною від CD13-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 31).

Таблиця 31

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,93E-05	2,78E-04	2,65E-03	3,58E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,20E-10	4,19E-10	4,00E-09	5,39E-10

Цитотоксичність Сполуки 1

- Активність Сполуки 1 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,1E-07 до 3,0E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 1, у двох незалежних експериментах, була до деякої міри гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 8,0E-04 до 6,3E-03 мкг/мл (9,4E-10 до 7,3E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 2,8E-03 мкг/мл (3,3E-09 M). Присутність maleimідного лінкера в Сполуці 1 не змінювала суттєво цитотоксичну активність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 4. Крім того, цитотоксичність сполуки не залежала від CD13-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 32).

Таблиця 32

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 1

	Сполука 1			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	8,05E-04	1,65E-03	6,25E-03	2,50E-03
IC ₅₀ (молярний)	9,39E-10	1,93E-09	7,31E-09	2,92E-09

Цитотоксичність ADC9

- Цитотоксичну активність ADC9 випробували проти різних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (максимальна концентрація 0,1 мкг/мл) представлена на фіг. 19.
- Кон'югат ADC9 показав суттєву специфічність проти CD13+ експресуючих клітин, у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, подібну або трохи вище, ніж у вихідних Сполук 4 і 1. Обидві CD13+ клітинні лінії, NB4 і U937, показали порівнянну чутливість проти ADC9, з середніми IC₅₀-значеннями 8,7E-03 і 2,4E-02 мкг/мл, відповідно. Дві CD13-негативні клітинні лінії, Raji і RPMI-8226, показали суттєво більш низьку чутливість проти ADC9, з середніми IC₅₀-значеннями 1,6E+00 і 5,9E-01 мкг/мл, відповідно. У середньому, CD13+ клітинні лінії (середнє значення IC₅₀ 1,66E-02 мкг/мл) були приблизно в 65 разів більш чутливими до ADC9, ніж клітини CD13- (середнє значення IC₅₀ 1,08E+00 мкг/мл). При порівнянні активності ADC9 у NB4-клітинах (найбільш чутливі) та Raji-клітинах (найменш чутливі), була виявлена різниця приблизно в 180 разів. Ці результати зовсім ясно показали специфічність кон'югата проти CD13 експресуючих клітин (Таблиця 33). Тому вважають, що ADC9, щонайменше частково, діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним CD13-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC9

	ADC9			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	8,75E-03	2,44E-02	1,57E+00	5,92E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-позитивні клітини				1,66E-02
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-негативні клітини				1,08E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC9, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC при 50 або 0,1 мкг/мл, представлені на фіг. 20. При рівній концентрації 50 мкг/мл, анти-CD13 антитіло окремо не продемонструвало ніякої цитотоксичної активності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD13-статусу. З іншого боку, ADC9-кон'югат показав сильну цитотоксичну активність проти всіх клітинних ліній, індукуючи інгібування клітинного виживання більше ніж 80 %. При концентрації 0,1 мкг/мл, кон'югат ADC9 показав цитотоксичну активність проти CD13-позитивних клітин, подібну тій, котру спостерігали при 50 мкг/мл, але без якого-небудь помітного ефекту на CD13-негативні клітини. Ці результати додатково продемонстрували чудову цитотоксичну активність і специфічність ADC9 проти CD13 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 10. Цитотоксичність ADC10 і відповідних реагентів проти CD13-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC10, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 12 і 4, оцінювали проти різних пухлинних клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD13-рецептор, включаючи NB4 і U937 (CD13-позитивні клітини) і Raji і RPMI-8226 (CD13-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4, у двох незалежних експериментах, була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні, від 7,9E-05 до 2,65E-03 мкг/мл (1,2E-10 до 4,0E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 8,4E-04 мкг/мл (еквівалентно 1,2E-09 M). Таким чином, цитотоксичність Сполуки 4 була досить незалежною від CD13-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 34).

Таблиця 34

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,93E-05	2,78E-04	2,65E-03	3,58E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,20E-10	4,19E-10	4,00E-09	5,39E-10

Цитотоксичність Сполуки 12

Активність Сполуки 12 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (7,9E-07 до 2,0E-10 M). Цитотоксична активність Сполуки 12, у двох незалежних експериментах, була до деякої міри гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 4,4E-03 до 4,8E-02 мкг/мл (3,5E-09 до 3,8E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 2,0E-02 мкг/мл (1,6E-08 M). Присутність довгого лінкера в Сполуці 12 знижувала (приблизно 1 log) цитотоксичну активність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 4. Крім

того, цитотоксичність сполуки не залежала від CD13-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 35).

Таблиця 35

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполука 12

	Сполука 12			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	4,45E-03	1,07E-02	4,80E-02	1,90E-02
IC ₅₀ (молярний)	3,53E-09	8,44E-09	3,80E-08	1,51E-08

5 Цитотоксичність ADC10

Цитотоксичну активність ADC10 випробували проти різних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (максимальна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 21.

Кон'югат ADC10 показав суттєву специфічність проти CD13+ експресуючих клітин, у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, яка подібна або трохи вище активності вихідних Сполук 4 і 12. Обидві CD13+ клітинні лінії, NB4 і U937, показали порівнянну чутливість проти ADC10, з середніми IC₅₀-значеннями 7,2E-03 і 9,8E-03 мкг/мл, відповідно. Дві CD13-негативні клітинні лінії, Raji і RPMI-8226, показали суттєво більш низьку чутливість проти ADC10, з середніми IC₅₀-значеннями 1,0E+01 і 5,3E+00 мкг/мл, відповідно. У середньому, CD13+ клітинні лінії (середнє значення IC₅₀ 8,50E-03 мкг/мл) були приблизно в 900 разів більш чутливими до ADC10, ніж клітини CD13- (середнє значення IC₅₀ 7,83E+00 мкг/мл). При порівнянні активності ADC10 у клітинах NB4 (найбільш чутливі) та клітинах Raji (найменш чутливі) була виявлена різниця приблизно в 1440 разів. Ці результати зовсім ясно показали специфічність ADC10 проти CD13 експресуючих клітин (Таблиця 36). Тому вважають, що ADC10, щонайменше частково, діяв через взаємодію mAb з мембранозв'язаним CD13-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Таблиця 36

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC10

	ADC10			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	7,18E-03	9,81E-03	1,04E+01	5,30E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-позитивні клітини				8,50E-03
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-негативні клітини				7,83E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC10, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC при 50 або 1 мкг/мл, представлені на фіг. 22. При рівній концентрації 50 мкг/мл, анти-CD13 антитіло окремо не продемонструвало ніякої цитотоксичної активності проти будь-якої з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD13-статусу. З іншого боку, ADC10 кон'югат показав сильну цитотоксичну активність проти всіх клітинних ліній, індукуючи інгібування клітинного виживання більше ніж 80 %, за винятком Raji-клітин, у яких він викликав більш низьке, але усе ще суттєве, інгібування приблизно 70 %. При концентрації 1 мкг/мл, ADC10 показав цитотоксичну активність проти CD13-позитивних клітин, подібну тій, котру спостерігали при 50 мкг/мл, але без якого-небудь помітного ефекту на CD13-негативні клітини. Ці результати додатково продемонстрували чудову цитотоксичну активність і специфічність ADC10 проти CD13 експресуючих пухлинних клітин людини in vitro.

Приклад біоактивності 11. Цитотоксичність ADC11 і відповідних реагентів проти CD13-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC11, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 13 і 40, оцінювали проти різних пухлинних клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD13-рецептор, включаючи NB4 і U937 (CD13-позитивні клітини) і Raji і RPMI-8226 (CD13-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 M). Цитотоксична активність Сполуки 40, у двох незалежних експериментах, була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому пікомолярному діапазоні, від 3,1E-05 до 1,7E-04 мкг/мл (5,2E-11 до 2,8E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 8,6E-05 мкг/мл (еквівалентно 1,4E-10 M). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від рівнів експресії CD13 на пухлинних клітинних лініях (Таблиця 37).

Таблиця 37

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	3,15E-05	7,10E-05	1,70E-04	7,05E-05
IC ₅₀ (молярний)	5,20E-11	1,17E-10	2,80E-10	1,16E-10

Цитотоксичність Сполуки 13

Активність Сполуки 13 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,3E-07 до 3,4E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 13, у двох незалежних експериментах, була до деякої міри гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 1,7E-03 до 1,0E-02 мкг/мл (2,7E-09 до 1,4E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 4,3E-03 мкг/мл (5,7E-09 M). Присутність тіолвмісної кінцевої групи у Сполуці 13 знижувало (менше ніж 1 log) цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 40. Цитотоксичність сполуки була досить незалежною від CD13-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 38).

Таблиця 38

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 13

	Сполука 13			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,70E-03	2,85E-03	1,03E-02	2,30E-03
IC ₅₀ (молярний)	2,26E-09	3,80E-09	1,37E-08	3,06E-09

30 Цитотоксичність ADC11

Цитотоксичну активність ADC11 випробували проти різних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, у двох незалежних експериментах. Репрезентативна DR-крива (максимальна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 23. ADC11 показав деяку, але невелику, специфічність проти CD13 експресуючих клітин. Кон'югат мав приблизно схожу цитотоксичну активність, за винятком Raji-клітин, що є трохи менш чутливими, у всіх випробовуваних клітинних лініях. Активність ADC11 була порівнянна з активністю вихідної Сполуки 13, з IC₅₀-значеннями в низькому наномолярному діапазоні (Таблиця 39).

40

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC11

	ADC11			
	Клітинні лінії			
	CD13+		CD13-	
	NB4	U937	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,27E-01	6,77E-01	3,48E+00	6,95E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-позитивні клітини				4,52E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD13-негативні клітини				2,09E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD13 mAb, використовуюваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC11, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC11 (50 або 1 мкг/мл), представлені на фіг. 24. При концентрації 50 мкг/мл, анти-CD13 антитіло окремо показало деяку цитотоксичну активність проти CD13+ клітинних ліній, викликаючи інгібування клітинного виживання приблизно 30 %. У клітинах CD13- антитіло було фактично неактивним. При такій же концентрації, ADC11-кон'югат показав сильну цитотоксичну активність проти всіх клітинних ліній, з деякою, але дуже низькою специфічністю проти CD13 експресуючих клітин, у яких він індукував зниження клітинного виживання близько 100 %. У клітинах CD13-ADC11 індукував більше ніж 80 % зниження клітинного виживання. При концентрації 1 мкг/мл, ADC11 показав більш високу специфічність проти клітин CD13+, NB4 і U937, у яких він індукував зниження клітинного виживання 99 % і 85 %, відповідно. У клітинах CD13-, Raji і RPMI8226, кон'югат індукував зниження клітинного виживання 38 % і 60 %, відповідно.

Приклад біоактивності 12. Цитотоксичність ADC12 і відповідних реагентів проти CD20-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC12, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1, 4 і 40, оцінювали проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD20-антиген, включаючи Raji (CD20-позитивні клітини); RPMI-8226 і Karpas-299 (CD20-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Ритуксимабу

Насамперед, in vitro цитотоксичну активність mAb Ритуксимабу, використовуюваного окремо, випробували проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD20-антиген, включаючи Raji (CD20-позитивні клітини); RPMI-8226 і Karpas-299 (CD20-негативні клітини). В одержаних у трьох повторностях DR-кривих, що охоплюють від 5,0E+01 до 1,3E-02 мкг/мл (3,3E-07 до 8,7E-11 М), антитіло було досить неактивним, не досягаючи значень IC₅₀ у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD20-статусу (Таблиця 40).

Таблиця 40

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Ритуксимабу

	Ритуксимаб		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
IC ₅₀ (молярний)	>3,48E-07	>3,48E-07	>3,48E-07

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної сполуки Сполука 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 М). Цитотоксична активність Сполуки 40 була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому субнанолярному діапазоні, від 4,6E-05 до 1,3E-04 мкг/мл (7,6E-11 до 2,1E-10 М), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 9,6E-05 мкг/мл (еквівалентно 1,6E-10 М). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 41).

Таблиця 41

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,15E-04	8,65E-05	8,60E-05
IC ₅₀ (молярний)	1,90E-10	1,43E-10	1,42E-10

Цитотоксичність Сполуки 4

- Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4 була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 5,7E-04 до 1,4E-03 мкг/мл (8,6E-10 до 2,1E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 9,7E-04 мкг/мл (1,5E-09 M). Присутність аміновмісної групи в Сполуці 4 злегка знижувала цитотоксичну активність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 40. Цитотоксична активність Сполуки 4 також не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 42).

Таблиця 42

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,41E-03	5,70E-04	9,30E-04
IC ₅₀ (молярний)	2,12E-09	8,59E-10	1,40E-09

Цитотоксичність Сполуки 1

- Активність Сполуки 1 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,2E-07 до 3,0E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 1, у двох незалежних експериментах, була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 1,6E-03 до 2,8E-03 мкг/мл (1,9E-09 до 3,3E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 2,1E-03 мкг/мл (2,5E-09 M). Присутність малеїмідного лінкера в Сполуці 1 суттєво не змінювала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 4. Крім того, цитотоксичність сполуки також не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 43).

Таблиця 43

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 1

	Сполука 1		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,85E-03	1,60E-03	1,90E-03
IC ₅₀ (молярний)	3,33E-09	1,87E-09	2,22E-09

Цитотоксичність ADC12

- Цитотоксичну активність ADC12 випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 25. Хоча він показав більш високу активність у CD20-позитивних клітинах

5 Raji, ADC12 продемонстрував приблизно однакову цитотоксичну активність у всіх випробовуваних клітинних лініях. Клітини Raji (CD20+) показали середнє значення IC_{50} $9,5E-02$ мкг/мл, тоді як RPMI-8226 і Karpas-299 (обидві CD20-) показали $4,0E-01$ і $4,1E-01$ мкг/мл, відповідно (Таблиця 44). Таким чином, CD20-позитивні клітини були трохи більш чутливими (у 4 рази) до ADC12, ніж CD20-негативні клітини.

Таблиця 44

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC12

	ADC12		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC_{50} (мкг/мл)	$9,54E-02$	$3,97E-01$	$4,13E-01$
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) CD20-позитивні клітини	$9,54E-02$		
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) CD20-негативні клітини	$4,05E-01$		

10 Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Ритуксимабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC12, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC12 (1 і $0,1$ мкг/мл), представлені на фіг. 26. Ритуксимаб окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був фактично неактивним у всіх випробовуваних клітинних лініях, незалежно від їх CD20-статусу. З іншого боку, ADC12-кон'югат, при концентрації 1 мкг/мл, показав сильну цитотоксичну активність у всіх випробовуваних клітинних лініях, викликаючи більше ніж 70% зниження клітинного виживання після 72 годин обробки. При більш низькій концентрації, $0,1$ мкг/мл, ADC12-кон'югат показав деяку специфічність, викликаючи зниження клітинного виживання близько 60% у CD20-позитивних клітинах (Raji), при цьому він був фактично неактивним у CD20-негативних клітинах (RPMI-8226 і Karpas-299).

20 Приклад біоактивності 13. Цитотоксичність ADC13 і відповідних реагентів проти CD20-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC13, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуки 1, 4 і 40, оцінювали проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD20-антиген, включаючи Raji (CD20-позитивні клітини); RPMI-8226 і Karpas-299 (CD20-негативні клітини). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

25 Цитотоксичність Сполуки 40

30 Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень ($1/2,5$ відношення) від $01E-03$ до $2,6E-07$ мкг/мл ($1,7E-09$ до $4,3E-13$ М). Цитотоксична активність Сполуки 40 була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в низькому субнанолярному діапазоні, від $8,6E-05$ до $1,1E-04$ мкг/мл ($1,4E-10$ до $1,9E-10$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $9,6E-05$ мкг/мл (еквівалентно $1,6E-10$ М). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 45).

Таблиця 45

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна мієлома	NHL
IC_{50} (мкг/мл)	$1,15E-04$	$8,65E-05$	$8,60E-05$
IC_{50} (молярний)	$1,90E-10$	$1,43E-10$	$1,42E-10$

35 Цитотоксичність Сполуки 4

40 Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень ($1/2,5$ відношення) від $01E-02$ до $2,6E-06$ мкг/мл ($1,5E-08$ до $4,0E-12$ М). Цитотоксична активність Сполуки 4 була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в нанолярному діапазоні, від $5,7E-04$ до $1,4E-03$ мкг/мл ($8,6E-10$ до $2,1E-09$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $9,7E-04$ мкг/мл ($1,5E-09$ М).

Присутність аміновмісної групи в Сполуці 4 злегка знижувала цитотоксичну активність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 40. Цитотоксична активність Сполуки 4 також не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 46).

Таблиця 46

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна міелома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,41E-03	5,70E-04	9,30E-04
IC ₅₀ (молярний)	2,12E-09	8,59E-10	1,40E-09

5

Цитотоксичність Сполуки 12

Активність Сполуки 12 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E+00 до 2,6E-04 мкг/мл (7,9E-07 до 2,1E-10 M). Цитотоксична активність Сполуки 12, у двох незалежних експериментах, була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 2,2E-02 до 6,7E-02 мкг/мл (1,8E-08 до 5,5E-08 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 3,9E-02 мкг/мл (3,1E-08 M). Присутність малеїмідвмісного лінкера в Сполуці 12 знижувала цитотоксичну активність сполуки, у порівнянні зі Сполукою 4 і Сполукою 40. Крім того, цитотоксичність сполуки також не залежала від CD20-статусу пухлинних клітинних ліній (Таблиця 47).

10

15

Таблиця 47

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 12

	Сполука 12		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна міелома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	6,95E-02	2,25E-02	2,50E-02
IC ₅₀ (молярний)	5,51E-08	1,78E-08	1,98E-08

Цитотоксичність ADC13

Цитотоксичну активність ADC13 випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 27. Хоча і більш високу в CD20-позитивних клітинах Raji, ADC13 показав практично однакову цитотоксичну активність, у наномолярному діапазоні, у всіх випробовуваних клітинних лініях. Клітини Raji (CD20+) показали середнє IC₅₀-значення 2,5E+01 мкг/мл, тоді як відповідні значення для клітин RPMI-8226 і Karpas-299 (обидві CD20-) були 1,1E+00 мкг/мл (Таблиця 48). Таким чином, CD20-позитивні клітини були трохи більш чутливими (приблизно в 5 разів) до ADC13, ніж CD20-негативні клітини.

20

25

Таблиця 48

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC13

	ADC13		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Лімфома Беркіта	Множинна міелома	NHL
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,53E-01	1,08E+00	1,07E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD20-позитивні клітини			2,53E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD20-негативні клітини			1,07E+00

30

Для графічного порівняння цитотоксичної активності mAb Ритуксимабу, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC13, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній mAb окремо (50 мкг/мл) або кон'югатом ADC13 (1 і 0,1 мкг/мл), представлені на фіг. 28. Ритуксимаб, використовуваний окремо, при концентрації 50 мкг/мл був фактично неактивним у всіх випробовуваних клітинних лініях, незалежно від їх CD20-статусу. З іншого боку, ADC13 показав, при обох концентраціях 1 і 0,1 мкг/мл, цитотоксичну активність, з деякою специфічністю відносно CD20 експресуючих клітин Raji. При концентрації 1 мкг/мл, ADC13 викликав, після 72 годин обробки, більше ніж 65 % зниження клітинного виживання клітин Raji (CD20+), при цьому індуючи 35-45 % у клітинах RPMI-8226 і Karpas-299 (CD20-), відповідно. При 0,1 мкг/мл, ADC13 кон'югат показав більш чітку специфічність, викликаючи зниження клітинного виживання приблизно 50 % у CD20-позитивних клітинах, будучи при цьому фактично неактивним у CD20-негативних клітинах.

Приклад біоактивності 14. Цитотоксичність ADC14 і відповідних реагентів проти CD5-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC14, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1, 4 і 40, оцінювали проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD5-антиген, включаючи Karpas-299 і MOLT-4 (обидві CD5+); Raji і RPMI-8226 (обидві CD5-). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність анти-CD5 mAb

Насамперед, in vitro цитотоксичну активність анти-CD5 мишачого mAb окремо випробували проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD5-антиген, включаючи Karpas-299 і MOLT-4 (обидві CD5+); Raji і RPMI-8226 (обидві CD5-). В одержаних у трьох повторностях DR-кривих, що охоплюють від 5,0E+01 до 1,3E-02 мкг/мл (3,3E-07 до 8,7E-11 M), у двох незалежних експериментах, антитіло було фактично неактивним, не досягаючи значень IC₅₀ у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD5-статусу (Таблиця 49).

Таблиця 49

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності анти-CD5 mAb

	Анти-CD5 mAb			
	Клітинні лінії			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
IC ₅₀ (молярний)	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 M). Цитотоксична активність Сполуки 40 була найвищою мірою гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому субнанолярному діапазоні, від 7,5E-05 до 3,6E-04 мкг/мл (1,2E-10 до 5,9E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,6E-04 мкг/мл (еквівалентно 2,6E-10 M). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 50).

Таблиця 50

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40			
	Клітинні лінії			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,12E-04	9,35E-05	3,60E-04	7,55E-05
IC ₅₀ (молярний)	1,85E-10	1,54E-10	5,94E-10	1,25E-10

Цитотоксичність Сполуки 4

- 5 Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4 була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 6,3E-04 до 2,7E-03 мкг/мл (9,5E-10 до 4,1E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,3E-03 мкг/мл (1,9E-09 M). Присутність аміновмісної групи в Сполучі 4 знижувала цитотоксичну активність сполуки (приблизно 1 log), у порівнянні зі Сполучкою 40. Цитотоксична активність Сполуки 4 також не залежала від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 51).

Таблиця 51

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітинні лінії			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	9,15E-04	9,10E-04	2,70E-03	6,30E-04
IC ₅₀ (молярний)	1,38E-09	1,37E-09	4,07E-09	9,50E-10

10

Цитотоксичність Сполуки 1

- 15 Активність Сполуки 1 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,2E-07 до 3,0E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 1 була практично гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, за винятком клітин Raji, у яких сполука була менш активною, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 1,8E-03 до 1,1E-02 мкг/мл (2,2E-09 до 1,3E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 4,6E-03 мкг/мл (5,3E-09 M). Присутність maleimide-лінкера в Сполучі 1 не змінювала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполучкою 4. Цитотоксичність сполуки також не залежала від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 52).

20

Таблиця 52

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 1

	Сполука 1			
	Клітинні лінії			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,15E-03	3,35E-03	1,09E-02	1,85E-03
IC ₅₀ (молярний)	2,51E-09	3,91E-09	1,28E-08	2,16E-09

Цитотоксичність ADC14

- 25 Цитотоксичну активність ADC14 випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 29. ADC14 показав деяку тенденцію селективності проти CD5-позитивних клітин, Karpas-299 і
- 30 хоча середні IC₅₀-значення, у середньому наномолярному діапазоні, були приблизно однаковими у всіх випробовуваних клітинних лініях, незалежно від їх CD5-статусу (Таблиця 53).

Таблиця 53

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC14

	ADC14			
	Клітинні лінії			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI-18226
IC ₅₀ (мкг/мл)	5,56E-01	6,18E-01	4,23E+00	5,47E+00
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD5-позитивні клітини				5,87E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD5-негативні клітини				2,39E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD5 mAb, використовуюваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC14, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC14 (1 і 0,1 мкг/мл), представлені на фіг. 30. Анти-CD5 mAb, використовуваний окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був фактично неактивним у всіх випробовуваних клітинних лініях. ADC14, при концентрації 1 мкг/мл, показав специфічну цитотоксичну активність проти CD5-позитивних клітин, Karpas-299 і MOLT-4, індукуючи інгібування клітинного виживання приблизно 84 % і 70 %, відповідно, при цьому був фактично неактивним у CD5-негативних клітинах (фіг. 30).

Приклад біоактивності 15. Цитотоксичність ADC16 і відповідних реагентів проти CD4-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC16, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1, 4 і 40, оцінювали проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD4-антиген, включаючи Karpas-299 і U937 (обидві CD4+); Raji і RPMI-8226 (обидві CD4-). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність анти-CD4 mAb

Насамперед, in vitro цитотоксичну активність анти-CD4 мишачого mAb, використовуюваного окремо, випробували проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD4-антиген, включаючи Karpas-299 і U937 (обидві CD4+); Raji і RPMI-8226 (обидві CD4-). В одержаних у трьох повторностях DR-кривих, що охоплюють від 5,0E+01 до 1,3E-02 мкг/мл (3,3E-07 до 8,7E-11 M), у двох незалежних експериментах, антитіло було фактично неактивним, не досягаючи значень IC₅₀ у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD4-статусу (Таблиця 54).

Таблиця 54

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності анти-CD4 mAb

	Анти-CD4 mAb			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
IC ₅₀ (молярний)	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 M). Цитотоксична активність Сполуки 40 була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому субнанолярному діапазоні, від 7,9E-05 до 2,8E-04 мкг/мл (1,3E-10 до 4,7E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,5E-04 мкг/мл (еквівалентно 2,5E-10 M). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від рівнів експресії CD4 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 55).

Таблиця 55

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,30E-04	7,90E-05	1,20E-04	2,85E-04
IC ₅₀ (молярний)	2,15E-10	1,31E-10	1,98E-10	4,70E-10

Цитотоксичність Сполуки 4

- 5 Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4 також була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 6,1E-04 до 2,7E-03 мкг/мл (9,2E-10 до 4,1E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,2E-03 мкг/мл (1,8E-09 M).
 10 Присутність аміновмісної групи в Сполучі 4 знижувала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполучкою 40. Цитотоксична активність Сполуки 4 також не залежала від рівнів експресії CD4 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 56).

Таблиця 56

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	9,10E-04	6,10E-04	6,35E-04	2,75E-03
IC ₅₀ (молярний)	1,38E-09	9,20E-10	9,60E-10	4,15E-09

Цитотоксичність Сполуки 1

- 15 Активність Сполуки 1 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,2E-07 до 3,0E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 1 також була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в наномолярному діапазоні, від 1,5E-03 до 7,3E-03 мкг/мл (1,7E-09 до 8,6E-09 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 3,4E-03 мкг/мл (3,9E-09 M).
 20 maleimidwмісного лінкера в Сполучі 1 не змінювала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполучкою 4. Цитотоксичність сполуки також не залежала від рівнів експресії CD4 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 57).

Таблиця 57

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 1

	Сполука 1			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,35E-03	1,50E-03	2,30E-03	7,35E-03
IC ₅₀ (молярний)	2,75E-09	1,75E-09	2,69E-09	8,57E-09

25 Цитотоксичність ADC16

Цитотоксичну активність ADC16 випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл)

представлена на фіг. 31. ADC16 показав деяку специфічність проти CD4-позитивних клітин, хоча середня різниця в чутливості відносно CD4-негативних клітин була відносно низкою, приблизно в 7 разів (з максимальною різницею між найменш і найбільш чутливою клітинною лінією, Raji і Karpas-299, відповідно, приблизно в 14 разів) (Таблиця 58). Хоча демонструючи невелике терапевтичне вікно, очевидно, щонайменше частина спостережуваної цитотоксичності ADC18 була опосередкована взаємодією mAb і CD4 глікопротеїну в клітинній мембрані пухлинних клітин.

Таблиця 58

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC16

	ADC16			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	4,70E-02	8,18E-02	2,60E-01	6,74E-01
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD4-позитивні клітини				6,44E-02
Середнє значення IC ₅₀ (мкг/мл) CD4-негативні клітини				4,67E-01

Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD4 mAb, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC16, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC16 (1 і 0,1 мкг/мл), представлені на фіг. 32. Анти-CD4 mAb, використовуваний окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був фактично неактивним у всіх випробовуваних клітинних лініях. З іншого боку, ADC16, при концентрації 1 мкг/мл, показав сильну цитотоксичну активність у всіх випробовуваних клітинних лініях, незалежно від їх CD4-статусу, викликаючи більше ніж 60 % зменшення (у межах 60-90 %) клітинного виживання після 72 годин обробки. Навіть при концентрації 0,1 мкг/мл, ADC16 показав специфічну цитотоксичну активність проти CD4-позитивних клітин, Karpas-299 і U937, індукуючи інгібування клітинного виживання приблизно 80 % і 70 %, відповідно, будучи при цьому неактивним проти CD4-негативних клітин (фіг. 32).

Приклад біоактивності 16. Цитотоксичність ADC17 і відповідних реагентів проти CD4-позитивних і негативних пухлинних клітин людини

In vitro цитотоксичну активність ADC17, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 12, 4 і 40, оцінювали проти різних ракових клітинних ліній людини, експресуючих або не експресуючих CD4-антиген, включаючи Karpas-299 і U937 (обидві CD4+); Raji і RPMI-8226 (обидві CD4-). Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 M). Цитотоксична активність Сполуки 40 була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC₅₀-значеннями в низькому субнанолярному діапазоні, від 7,9E-05 до 2,8E-04 мкг/мл (1,3E-10 до 4,7E-10 M), з середнім IC₅₀-значенням для серії цільноклітинних аналізів 1,5E-04 мкг/мл (еквівалентно 2,5E-10 M). Цитотоксичність Сполуки 40 не залежала від рівнів експресії CD4 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 59).

Таблиця 59

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,30E-04	7,90E-05	1,20E-04	2,85E-04
IC ₅₀ (молярний)	2,15E-10	1,31E-10	1,98E-10	4,70E-10

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична

активність Сполуки 4 також була гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в наномолярному діапазоні, від $6,1E-04$ до $2,7E-03$ мкг/мл ($9,2E-10$ до $4,1E-09$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $1,2E-03$ мкг/мл ($1,8E-09$ М). Присутність аміновмісної групи в Сполуці 4 знижувала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 40. Цитотоксична активність Сполуки 4 також не залежала від рівнів експресії CD4 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 60).

Таблиця 60

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC_{50} (мкг/мл)	$9,10E-04$	$6,10E-04$	$6,35E-04$	$2,75E-03$
IC_{50} (молярний)	$1,38E-09$	$9,20E-10$	$9,60E-10$	$4,15E-09$

Цитотоксичність Сполуки 12

Активність Сполуки 12 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень ($1/2,5$ відношення) від $01E+00$ до $2,6E-04$ мкг/мл ($7,9E-07$ до $2,1E-10$ М). Цитотоксична активність Сполуки 12, у двох незалежних експериментах, була відносно гомогенною в різних випробовуваних клітинних лініях, з IC_{50} -значеннями в наномолярному діапазоні, від $7,3E-02$ до $4,1E-01$ мкг/мл ($5,8E-08$ до $3,2E-07$ М), з середнім IC_{50} -значенням для серії цільноклітинних аналізів $1,7E-01$ мкг/мл ($1,3E-07$ М). Присутність довгого малеїмідвмісного лінкера в Сполуці 12 сильно знижувала цитотоксичну активність сполуки в порівнянні зі Сполукою 40 (близько 3 log) і Сполукою 4 (близько 2 log). Крім того, цитотоксичність сполуки також не залежала від рівнів експресії CD4 пухлинних клітинних ліній (Таблиця 61).

Таблиця 61

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 12

	Сполука 12			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC_{50} (мкг/мл)	$7,65E-02$	$7,30E-02$	$1,15E-01$	$4,15E-01$
IC_{50} (молярний)	$6,07E-08$	$5,79E-08$	$9,11E-08$	$3,29E-07$

Цитотоксичність ADC17

Цитотоксичну активність ADC17 випробували проти різних пухлинних клітинних ліній. Кон'югат випробували в чотирьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, $1/2,5$ відношення), виходячи з 50, 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 1 мкг/мл) представлена на фіг. 33. ADC17 показав специфічність проти CD4-позитивних клітин, з середньою різницею в чутливості відносно CD4-негативних клітин приблизно в 40 разів (у межах від 11 до 64 разів) (Таблиця 62). Очевидно основна частина спостережуваної цитотоксичної активності ADC17 була опосередкована взаємодією mAb і CD4 глікопротеїну в клітинній мембрані пухлинних клітин.

Таблиця 62

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC17

	ADC17			
	Клітинні лінії			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI-18226	Raji
IC_{50} (мкг/мл)	$4,50E-02$	$3,86E-02$	$5,24E-01$	$2,90E+00$
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) CD4-позитивні клітини				$4,18E-02$
Середнє значення IC_{50} (мкг/мл) CD4-негативні клітини				$1,71E+00$

Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD4 mAb, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC17, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC17 (1 і 0,1 мкг/мл), представлені на фіг. 34. Анти-CD4 mAb окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був фактично неактивним у всіх випробовуваних клітинних лініях. З іншого боку, ADC17, при концентрації 1 мкг/мл, показав сильну цитотоксичну активність у трьох з чотирьох випробовуваних клітинних ліній (за винятком клітин Raji), викликаючи більше ніж 70 % зменшення (у межах від 72 % до 95 %) клітинного виживання після 72 годин обробки. Навіть при концентрації 0,1 мкг/мл, ADC17 показав специфічну цитотоксичну активність проти CD4-позитивних клітин, Karpas-299 і U937, індукуючи інгібування клітинного виживання приблизно 70 % і 75 %, відповідно, будучи при цьому зовсім неактивним проти CD4-негативних клітин (фіг. 34).

Приклад біоактивності 17. Цитотоксичність ADC14 і відповідних реагентів проти Raji-клітинних клонів з високою або нульовою CD5-експресією

In vitro цитотоксичну активність ADC14, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 1, 4 і 40, оцінювали проти Raji клітинних клонів, експресуючих або не експресуючих CD5-антиген. Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність анти-CD5 mAb

Насамперед, in vitro цитотоксичну активність анти-CD5 мишачого mAb, використовуваного окремо, випробували проти Raji клітинних клонів, експресуючих (C#10) або не експресуючих (C#18) CD5-антиген. В одержаних у трьох повторностях DR-кривих, що охоплюють від $5,0E+01$ до $1,3E-02$ мкг/мл ($3,3E-07$ до $8,7E-11$ M), у двох незалежних експериментах, антитіло було фактично неактивним, не досягаючи значень IC_{50} у якій-небудь з випробовуваних клітинних ліній, незалежно від їх CD5-статусу (Таблиця 63).

Таблиця 63

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності анти-CD5 mAb

	Анти-CD5 mAb	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC_{50} (мкг/мл)	$>5,0E+01$	$>5,0E+01$
IC_{50} (молярний)	$>3,3E-07$	$>3,3E-07$

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від $01E-03$ до $2,6E-07$ мкг/мл ($1,7E-09$ до $4,3E-13$ M). Цитотоксична активність Сполуки 40 була приблизно однаковою для CD5 експресуючих (клон#10) або не експресуючих (клон#18) клітин Raji, з середніми IC_{50} -значеннями в субнанолярному діапазоні, $4,95E-04$ і $8,90E-04$ мкг/мл (еквівалентно $8,17E-10$ і $1,47E-09$ M), відповідно. Хоча і трохи вище в CD5-позитивних клітинах, цитотоксичність Сполуки 40, очевидно, була досить незалежною від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 64).

Таблиця 64

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC_{50} (мкг/мл)	$4,95E-04$	$8,90E-04$
IC_{50} (молярний)	$8,17E-10$	$1,47E-09$

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4 була приблизно однаковою для CD5 експресуючих (клон#10) або не експресуючих (клон#18) клітин Raji, хоча в нульових клітинах сполука не досягала IC₅₀-значень.

У CD5-позитивних клітинах сполука показала середнє IC₅₀-значення 9,9E-03 мкг/мл (еквівалентно 1,57E-08 M). Хоча і трохи вище в CD5-позитивних клітинах, цитотоксичність Сполуки 4, очевидно, була досить незалежною від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (див. IC₅₀-значення в Таблиці 65 як посилання).

Таблиця 65

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

Сполука 4		
Raji-клітини		
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₂₀ (мкг/мл)	4,65E-03	6,77E-03
IC ₂₀ (молярний)	7,01E-09	1,02E-08
IC ₅₀ (мкг/мл)	9,90E-03	>1,00E-02
IC ₅₀ (молярний)	1,49E-08	>1,51E-08

Цитотоксичність Сполуки 1

Активність Сполуки 1 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-01 до 2,6E-05 мкг/мл (1,2E-07 до 3,0E-11 M). Цитотоксична активність Сполуки 1 є різною в двох Raji клітинних клонах, сполука більш активна у надекспресуючих CD5 клітинах (клон#10), ніж у CD5-нульових клітинах (клон#18), з середніми IC₅₀-значеннями 2,9E-03 і 3,8E-02 мкг/мл (еквівалентно 3,4E-09 і 4,4E-08 M), відповідно (Таблиця 66). У цьому випадку цитотоксичність Сполуки 1, очевидно, не була незалежною від CD5-статусу пухлинних клітинних ліній.

Таблиця 66

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 1

Сполука 1		
Raji-клітини		
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,90E-03	3,80E-02
IC ₅₀ (молярний)	3,39E-09	4,44E-08

Цитотоксичність ADC14

Цитотоксичну активність ADC14 випробували проти двох Raji-клонів. Кон'югат випробували в трьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 10 мкг/мл) представлена на фіг. 35. ADC14 показав специфічність проти CD5 експресуючих клітин (клон#10), у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, таку ж або навіть більш високу, ніж цитотоксичність вихідних Сполук 1, 4 і 40. У CD5 експресуючих клітинах Raji, кон'югат показав середнє IC₅₀-значення 1,6E-01 мкг/мл. У CD5-нульових клітинах кон'югат був більше ніж у 50 разів менш активним, ніж у CD5-позитивних клітинах, показуючи середнє IC₅₀-значення 9,0E-00 мкг/мл. Хоча і з деякими застереженнями, через трохи різну чутливість, спостережувану між двома Raji клітинними клонами проти деяких вихідних сполук, ці результати показують, що ADC14 мав специфічність проти CD5 експресуючих клітин (Таблиця 67). Тому вважають, що ADC14 діяв, щонайменше частково, через взаємодію mAb з мембранозв'язаним CD5-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC14

	ADC14	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,65E-01	9,00E+00

Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD5 mAb, використовуюваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC14, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC14 (10 мкг/мл), представлені на фіг. 36. Анти-CD5 mAb окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був неактивним проти двох Raji клітинних клонів. Навпаки, ADC14, при концентрації 10 мкг/мл, показав сильну і трохи селективну цитотоксичну активність проти CD5-позитивних клітин Raji (клон#10), викликаючи майже 90 % зниження клітинного виживання після 72 годин обробки. У тих же умовах, ADC14 викликав 30 % зниження клітинного виживання CD5-нульових клітин (клон#18) (фіг. 36).

Приклад біоактивності 18. Цитотоксичність ADC15 і відповідних реагентів проти Raji клітинних клонів з високою або нульовою CD5 експресією

In vitro цитотоксичну активність ADC15, поряд з вихідними цитотоксичними Сполуками 12, 4 і 40, оцінювали проти Raji клітинних клонів, експресуючих або не експресуючих CD5-антиген. Були одержані стандартні криві доза-відповідь (DR) для 72 годин.

Цитотоксичність Сполуки 40

Цитотоксичну активність вихідної Сполуки 40 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-03 до 2,6E-07 мкг/мл (1,7E-09 до 4,3E-13 M). Цитотоксична активність Сполуки 40 була приблизно однаковою для CD5 експресуючих (клон#10) або не експресуючих (клон#18) клітин Raji, з середніми IC₅₀-значеннями в субнаномольному діапазоні, 4,95E-04 і 8,90E-04 мкг/мл (еквівалентно 8,17E-10 і 1,47E-09 M), відповідно. Хоча і трохи вище в CD5-позитивних клітинах, цитотоксичність Сполуки 40, очевидно, була досить незалежною від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (Таблиця 68).

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 40

	Сполука 40	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₅₀ (мкг/мл)	4,95E-04	8,90E-04
IC ₅₀ (молярний)	8,17E-10	1,47E-09

Цитотоксичність Сполуки 4

Цитотоксичну активність Сполуки 4 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 4 була приблизно однаковою для CD5 експресуючих (клон#10) або не експресуючих (клон#18) клітин Raji, хоча в нульових клітинах сполука не досягала IC₅₀-значень. У CD5-позитивних клітинах сполука показала середнє IC₅₀-значення 9,9E-03 мкг/мл (еквівалентно 1,57E-08 M). Хоча і трохи вище в CD5-позитивних клітинах, цитотоксичність Сполуки 4, очевидно, була досить незалежною від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (див. IC₅₀-значення в Таблиці 69 як посилання).

Таблиця 69

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 4

	Сполука 4	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₂₀ (мкг/мл)	4,65E-03	6,77E-03
IC ₂₀ (молярний)	7,01E-09	1,02E-08
IC ₅₀ (мкг/мл)	9,90E-03	>1,00E-02
IC ₅₀ (молярний)	1,49E-08	>1,51E-08

Цитотоксичність Сполуки 12

- Активність Сполуки 12 оцінювали в DR-кривих з використанням десяти серійних розведень (1/2,5 відношення) від 01E-02 до 2,6E-06 мкг/мл (1,5E-08 до 4,0E-12 M). Цитотоксична активність Сполуки 12 була приблизно однаковою для CD5 експресуючих (клон#10) або не експресуючих (клон#18) клітин Raji, хоча в нульових клітинах сполука не досягала IC₅₀-значень. У CD5-позитивних клітинах сполука показала середнє IC₅₀-значення 2,7E-01 мкг/мл (еквівалентно 2,15E-07 M). Хоча і трохи вище в CD5-позитивних клітинах, цитотоксичність Сполуки 12, очевидно, була досить незалежною від рівнів експресії CD5 у пухлинних клітинних лініях (див. IC₅₀-значення в Таблиці 70 як посилання).

Таблиця 70

Узагальнені дані in vitro цитотоксичності Сполуки 12

	Сполука 12	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₂₀ (мкг/мл)	1,50E-01	2,00E-01
IC ₂₀ (молярний)	1,19E-07	1,59E-07
IC ₅₀ (мкг/мл)	2,70E-01	>1,00E+00
IC ₅₀ (молярний)	2,14E-07	>7,92E-07

Цитотоксичність ADC15

- Цитотоксичну активність ADC15 випробували проти двох Raji-клонів. Кон'югат випробували в трьох різних діапазонах концентрацій, кожний в одержаних у трьох повторностях DR-кривих (десять серійних розведень, 1/2,5 відношення), виходячи з 10, 1 і 0,1 мкг/мл, відповідно. Репрезентативна DR-крива (вихідна концентрація 10 мкг/мл) представлена на фіг. 37. ADC15 показав значну специфічність проти CD5 надекспресуючих клітин (клон#10), у яких сполука продемонструвала цитотоксичну активність, таку ж, як у вихідної Сполуки 40, і навіть більш високу, ніж у Сполук 4 і 12. У CD5 експресуючих клітинах Raji, кон'югат показав середнє IC₅₀-значення 9,3E-01 мкг/мл. У CD5-нульових клітинах кон'югат був більше ніж у 10 разів менш активним, ніж у CD5-позитивних клітинах, не досягаючи IC₅₀-значення. Хоча і з деякими застереженнями, через потенційну чутливість, спостережувану між двома Raji клітинними клонами проти деяких вихідних Сполук 4 і 12, ці результати показують, що ADC15 мав специфічність проти CD5 експресуючих клітин (Таблиця 71). Тому вважають, що ADC15 діяв, щонайменше частково, через взаємодію mAb з мембранозв'язаним CD5-рецептором на пухлинних клітинах, з наступною внутрішньоклітинною доставкою цитотоксичного лікарського засобу в тканину, що є мішенню.

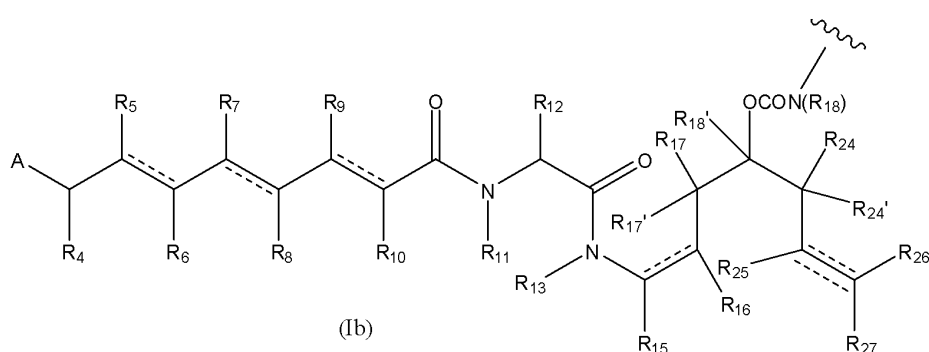
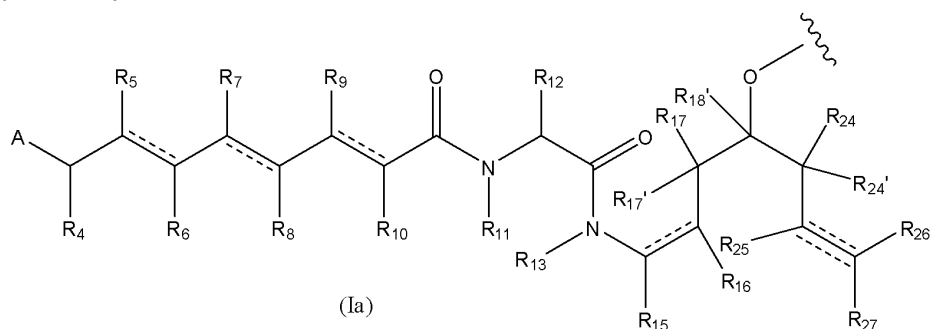
Узагальнені дані in vitro цитотоксичності ADC15

	ADC15	
	Raji-клітини	
	C#10 (високий CD5)	C#18 (нульовий CD5)
IC ₅₀ (мкг/мл)	9,30E-01	>1,0E+01

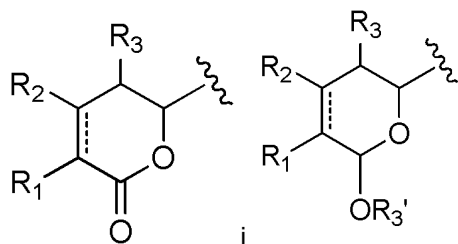
Для графічного порівняння цитотоксичної активності анти-CD5 mAb, використовуваного окремо, з цитотоксичністю кон'югата ADC15, гістограми, що показують відсотки клітинного виживання після обробки різних клітинних ліній одним тільки mAb (50 мкг/мл) або ADC15 (10 мкг/мл), представлені на фіг. 38. Анти-CD5 mAb окремо, при концентрації 50 мкг/мл, був неактивним проти двох Raji клітинних клонів, незалежно від їх CD5-статусу. Навпаки, ADC15, при концентрації 10 мкг/мл, показав сильну і селективну цитотоксичну активність проти CD5-позитивних клітин Raji (клон#10), викликаючи 80 % зниження клітинного виживання після 72 годин обробки. У тих же умовах, ADC15 був неактивним на CD5-нульових клітинах (клон#18) (фіг. 38).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат лікарського засобу, який включає групу лікарського засобу, ковалентно приєднану до іншої частини кон'югата лікарського засобу, що являє собою сполуку, яка має формулу [D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab, де D означає групу, що являє собою лікарський засіб, вибраний з формул (Ia) і (Ib), або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:



де хвилясті лінії формули (Ia) і (Ib) вказують місце ковалентного приєднання до (X)_b, якщо це має місце, або (AA)_w, якщо це має місце, або до лінкерної групи L; A вибраний з



де хвилясті лінії групи А вказують місце ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

кожний з R_1 , R_2 і R_3 незалежно вибраний з водню, OR_a , $OCOR_a$, $OCOOR_a$, NR_aR_b , NR_aCOR_b , $NR_aC(=NR_a)NR_aR_b$, заміщеного або незаміщеного C_1 - C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу і заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R ;

Якщо R_1 вибраний з водню, CO_{R_a} , $COOR_a$, $CONR_aR_b$, $S(O)R_a$, SO_2R_a , $P(O)(R_a)R_b$, заміщеного або незаміщеного C_1 - C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкенілу і заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x :

кожний з R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ і R₁₂ незалежно вибраний із групи, що складається з водню, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₂-алкілу, заміщеного або незаміщеного C₂-C₁₂-алкенілу і заміщеного або незаміщеного C₂-C₁₂-алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

R_{11} вибраний із групи, що складається з водню, COR_a , $COOR_a$, заміщеного або незаміщеного C_1 - C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу і заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу, або R_{11} і R_{12} разом з відповідним атомом N і атомом C, до яких вони приєднані, можуть утворювати 5-14-членну заміщену або незаміщену ненасичену або насичену гетероциклічну групу, яка містить одне або декілька кілець і необов'язково містить один або декілька додаткових гетероатомів, вибраних з атомів кисню, азоту і сірки, в зазначеному кільці (кільцях), на доповнення до атома азоту групи NR_{11} , де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

R_{13} вибраний із групи, що складається з водню, CO_2 , $COOR_a$, заміщеного або незаміщеного C_1 - C_{12} -алкілу, заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкенілу, заміщеного або незаміщеного C_2 - C_{12} -алкінілу і заміщеного або незаміщеного C_4 - C_{12} -алкенінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_y ;

кожний з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R_{17'}, R₁₈, R₂₄, R_{24'}, R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що складається з водню, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₂-алкілу, заміщеного або незаміщеного C₂-C₁₂-алкенілу і заміщеного або незаміщеного C₂-C₁₂-алкінілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_y;

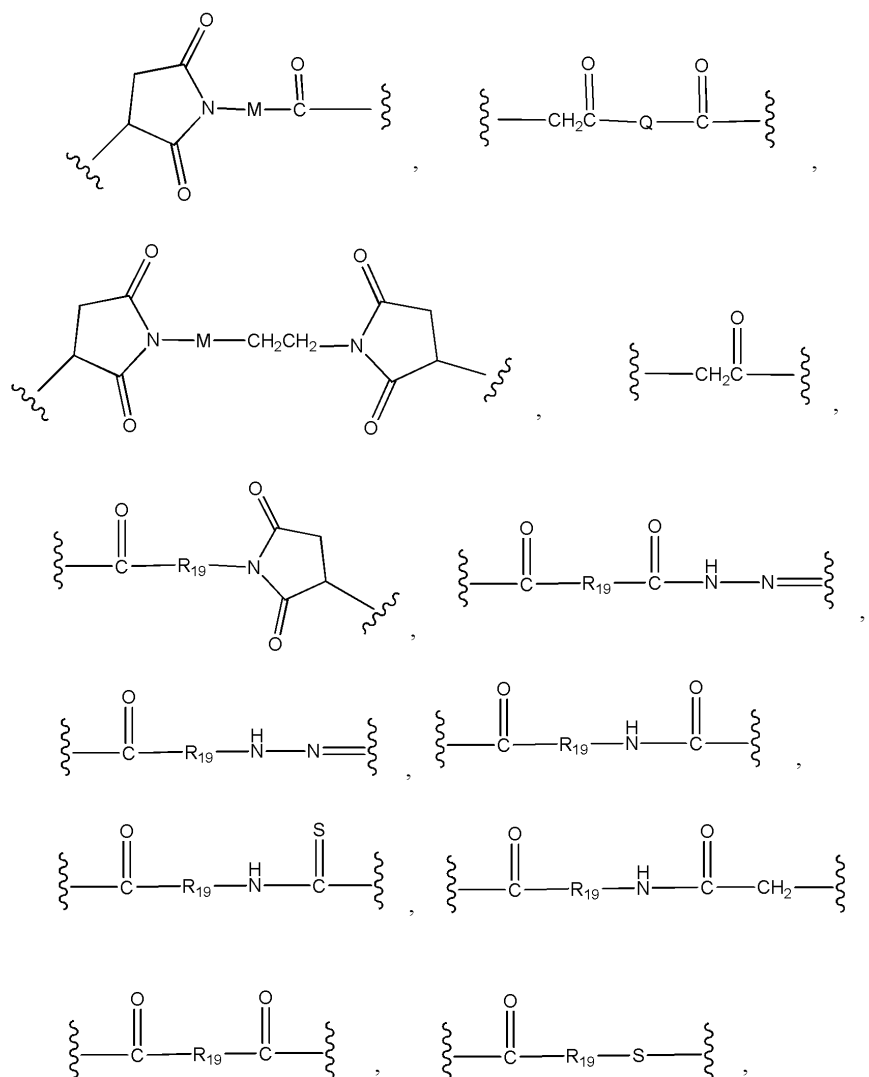
R₁₈ вибраний із групи, що включає водень, C₁-C₁₂-алкільні групи, які необов'язково можуть бути заміщені щонайменше однією групою R_x, арильні групи, які містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, і 5-14-членні заміщені або незаміщені ненасичені або насичені гетероциклічні групи, що містять одне або декілька кілець, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

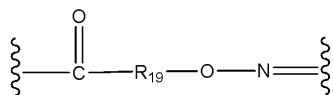
R₂₇ вибраний з водню, заміщеного або незаміщеного C₁-C₁₂-алкілу і галогену;

кожний з R_a і R_b незалежно вибраний із групи, що включає водень, заміщений або незаміщений C₁-C₁₂-алкіл, заміщений або незаміщений C₂-C₁₂-алкеніл, заміщений або незаміщений C₂-C₁₂-алкініл, заміщені або незаміщені арильні групи, які містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, і 5-14-членні заміщені або незаміщені ненасичені або насичені гетероциклічні групи, які містять одне або декілька кілець, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

замісники R_x вибрані з групи, що включає C_1 - C_{12} -алкільні групи, що можуть бути необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , C_2 - C_{12} -алкенільні групи, що можуть бути необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , C_2 - C_{12} -алкінільні групи, що можуть бути необов'язково заміщені щонайменше однією групою R_y , атоми галогену, оксогрупи, тіогрупи, ціаногрупи, нітрогрупи, OR_y , $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, $S(O)R_y$, SO_2R_y , $P(O)(R_y)OR_z$, NR_yR_z , NR_yCOR_z , $NR_yC(=O)NR_yR_z$, $NR_yC(=NR_y)NR_yR_z$, арильні групи, які містять від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками, які можуть бути однаковими або відмінними один від одного, вибраними з групи, що включає R_v , OR_v , $OCOR_v$, $OCOOR_v$, NR_vR_z , NR_vCOR_z і

- $NR_yC(=NR_y)NR_yR_z$, аранільні групи, які містять алкільну групу, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, заміщену необов'язково заміщеною арильною групою, визначеною вище, аранілоксигрупи, які містять алкоксигрупу, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, заміщену необов'язково заміщеною арильною групою, визначеною вище, і 5-14-членну насичену або
- 5 ненасичену гетероциклічну групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена гетероциклічна група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_y , і, коли більше ніж один необов'язковий замісник присутній на будь-якій даній групі, необов'язкові замісники R_y можуть бути однаковими або відмінними один від одного;
- 10 кожен R_y і R_z незалежно вибраний із групи, що включає водень, C_1 - C_{12} -алкільні групи, C_1 - C_{12} -алкільні групи, що заміщені щонайменше одним атомом галогену, аранільні групи, які включають C_1 - C_{12} -алкільну групу, що заміщена арильною групою, яка містить від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох кільцях, і гетероциклоалкільні групи, які включають C_1 - C_{12} -алкільну групу, що заміщена 5-14-членною ненасиченою або насиченою гетероциклічною
- 15 групою, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях);
- і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R_{25} , і атомом C, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні;
- 20 L являє собою лінкерну групу, вибрану з групи, що включає:





де

хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до Ab (хвиляста лінія праворуч) і (AA)_w, якщо це має місце, або (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч);

R₁₉ вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -C₃-C₈-карбоциклу-, -O-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₈-арилену в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-C₆-C₁₈-арилену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₈-арилен-C₁-C₁₂-алкілену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-, -(C₃-C₈-карбоцикло)-C₁-C₁₂-алкілен-, -C₅-C₁₄-гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₅-C₁₄-гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -(C₅-C₁₄-гетероцикло)-C₁-C₁₂-алкілену-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -(OCH₂CH₂)_r- і -CH₂-(OCH₂CH₂)_r-, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x;

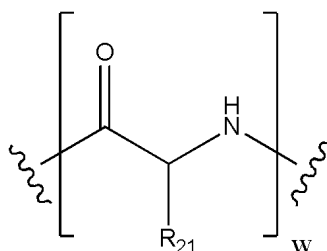
M вибраний із групи, що включає -C₁-C₆-алкілен-, -C₁-C₆-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-, -(CH₂CH₂O)_s-, -C₁-C₆-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-CON(H або C₁₋₆алкіл)-C₁-C₆-алкілен-, фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x, фенілен-C₁-C₆-алкілен-, де феніленова група може бути необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, і -C₁-C₆-алкілен-CON(H або C₁₋₆алкіл)-C₁-C₆-алкілен-;

Q вибраний із групи, що включає -N(H або C₁₋₆алкіл)фенілен- і -N(H або C₁₋₆алкіл)-(CH₂)_s;

r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10; i

s являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10;

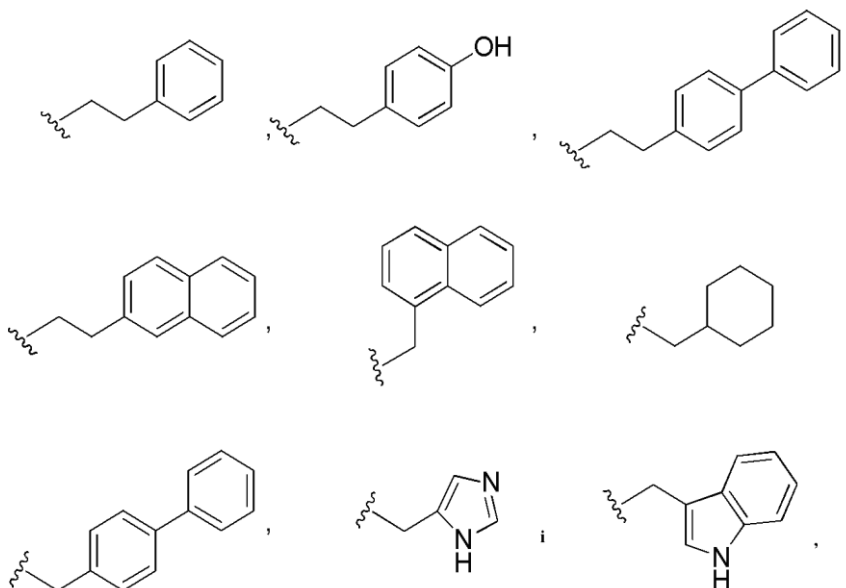
(AA)_w являє собою групу формули (II):



(II)

де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

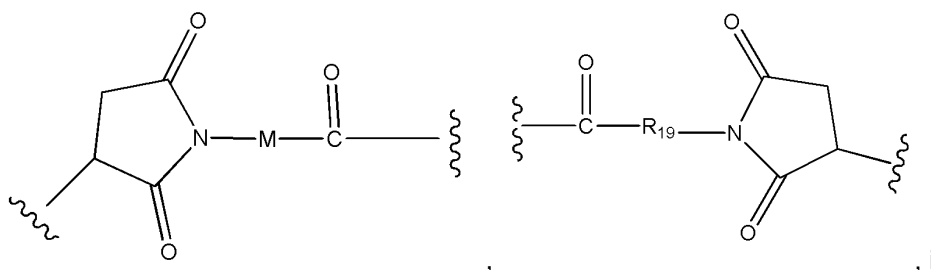
R₂₁ у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, ізобутил, втор-бутил, бензил, пара-гідроксибензил, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил,



i w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;

X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає:

- CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-;
- 5 -COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;
- CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;
- CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;
- 10 -COCH₂NH-COCH₂NH-;
- COCH₂NH-;
- CONH-(C₁-C₆-алкілен)S-;
- CONH-(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-;
- 15 -(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-;
- (C₁-C₆-алкілен)S-;
- (C₁-C₆-алкілен)NH-; i
- (C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;
- 20 b являє собою ціле число від 0 або 1;
- Ab являє собою компонент, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт; i
- n являє собою відношення групи [D-(X)_b-(AA)_w-(L)-] до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, i знаходиться в діапазоні від 1 до 20.
- 2. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1, де:
- 25 L являє собою лінкерну групу, вибрану з групи, що включає:



де:

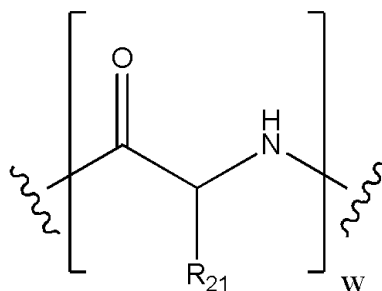
- хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до Ab (хвиляста лінія праворуч) і $(AA)_w$, якщо це має місце, або $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч);
- 30 R_{19} вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -O-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₂-арилу в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-

алкілен- C_6-C_{12} -арилу-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , - C_6-C_{12} -арилу- C_1-C_{12} -алкілену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , - C_5-C_{12} -гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , - C_1-C_{12} -алкілен-(C_5-C_{12} -гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , -(C_5-C_{12} -гетероцикло)- C_1-C_{12} -алкілену-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , -(OCH_2CH_2) $_r$ і - $CH_2-(OCH_2CH_2)$ $_r$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

M вибраний із групи, що включає - C_1-C_6 -алкілен-, - C_1-C_6 -алкілен-(C_3-C_8 -карбоцикло)- і фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 6;

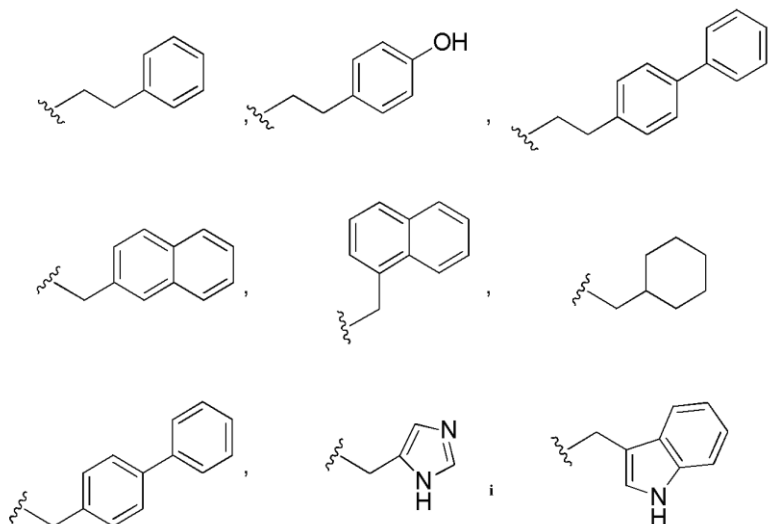
(AA) $_w$ являє собою групу формули (II):



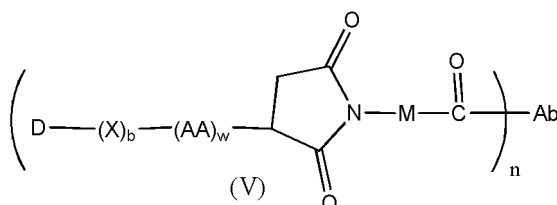
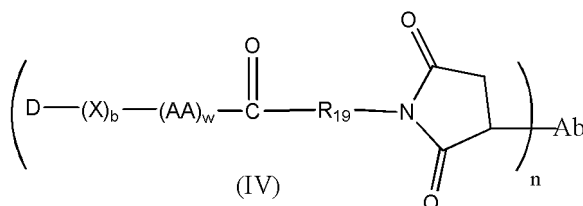
(II)

де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до (X) $_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, ізобутил, вторбутил, бензил, пара-гідроксибензил, - CH_2OH , - $CH(OH)CH_3$, - $CH_2CH_2SCH_3$, - CH_2CONH_2 , - CH_2COOH , - $CH_2CH_2CONH_2$, - CH_2CH_2COOH , -(CH_2) $_3$ NHC(=NH)NH $_2$, -(CH_2) $_3$ NH $_2$, -(CH_2) $_3$ NHCOCH $_3$, -(CH_2) $_3$ NHCHO, -(CH_2) $_4$ NHC(=NH)NH $_2$, -(CH_2) $_4$ NH $_2$, -(CH_2) $_4$ NHCOCH $_3$, -(CH_2) $_4$ NHCHO, -(CH_2) $_3$ NHCONH $_2$, -(CH_2) $_4$ NHCONH $_2$, - $CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл, циклогексил,

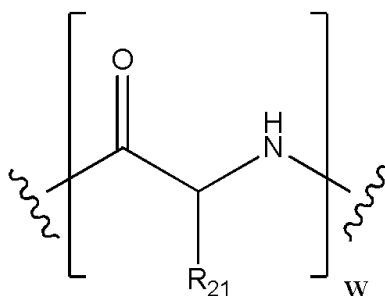


- w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 12;
 де X являє собою розширювальну групу, вибрану з -CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-, -COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-, -CONH-(C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-, -CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-, -COCH₂NH-COCH₂NH-, -COCH₂-NH-, -CONH-(C₁-C₆-алкілен)S-, -CONH-(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-, -(C₁-C₆-алкілен)NHCO(C₁-C₆-алкілен)S-, -(C₁-C₆-алкілен)S-, -(C₁-C₆-алкілен)NH- і -(C₁-C₆-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x)-NH-;
- D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де: R₁ вибраний з водню, OR_a і OCOR_a, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x; R₂ і R₃, кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x; R₃' вибраний з водню, COR_a і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де R_a являє собою заміщений або незаміщений C₁-C₆-алкіл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;
- кожен з R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ і R₁₂ незалежно вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;
- R₁₁ і R₁₃ незалежно вибрані з водню і заміщеного і незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;
- кожен з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₇', R₁₈', R₂₄, R₂₄', R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що включає: водень і заміщені або незаміщені C₁-C₆-алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, OCOR_y, OCOOR_y, COR_y, COOR_y, OCONR_yR_z, CONR_yR_z, NR_yR_z і NR_yCOR_z, де кожен з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;
- R₁₈ вибраний з водню, C₁₋₆-алкільної групи, що необов'язково може бути заміщена щонайменше однією групою R_x, арильної групи, що містить від 6 до 12 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, і 5-10-членної ненасиченої або насиченої гетероциклічної групи, що містить одне або декілька кілець, при цьому зазначена гетероциклічна група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, де замісники R_x вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, атоми галогену, алкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, і діалкіламіногрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;
- R₂₇ вибраний з водню, галогену і заміщеного і незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x; кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R₂₅, і атомом C, до якого приєднані R₂₆ і R₂₇, тоді R₂₅ і або R₂₆, або R₂₇ відсутні;
- компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент і вибраний із групи, що включає антитіло людини, антигензв'язувальний фрагмент антитіла людини, гуманізоване антитіло, антигензв'язувальний фрагмент гуманізованого антитіла, химерне антитіло, антигензв'язувальний фрагмент химерного антитіла, глікозилизоване антитіло і глікозилований антигензв'язувальний фрагмент; і n являє собою відношення групи [D-(X)_b-(AA)_w-(L)-] до компонента Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 1 до 12.
3. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1, вибраний з формул (IV) і (V):



де:

- 5 R_{19} вибраний з -C₁-C₈-алкілену-, -O-(C₁-C₈-алкілену), -C₁-C₈-алкілен-C₆-C₁₂-арилену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₂-арилен-C₁-C₈-алкілену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, може бути
- 10 необов'язково заміщений одним або декількома замісниками R_x;
- M вибраний із групи, що включає -C₁-C₃-алкілен-, -C₁-C₃-алкілен-(C₅-C₇-карбоцикло)-;
- (AA)_w являє собою формулу (II):



(II)

- 15 де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);
- R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, втор-бутил, бензил, індолілметил, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂ і -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂;
- 20 w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 6;
- X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-, -COO-CH₂-фенілен-NH-, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що може бути
- 25 необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, -COCH₂NH-COCH₂-NH-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)S-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NH- і -(C₂-C₄-алкілен)NH-COO-CH₂-(фенілен, що
- 30 може бути необов'язково заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-;
- D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R_1 являє собою водень або метокси;
кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;
 R_3' являє собою водень;

кожний з $R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ і R_{12} незалежно вибраний з водню, заміщеного або
5 незаміщеного метилу, заміщеного або незаміщеного ізопропілу і заміщеного або незаміщеного
трет-бутилу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x ;

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

кожний з $R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{17}', R_{18}', R_{24}, R_{24}', R_{25}$ і R_{26} незалежно вибраний із групи, що включає:

водень і заміщені або незаміщені C_1 - C_6 -алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з
10 групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи,
оксогрупи, атоми галогену, $OCOR_y$, $OCOOR_y$, COR_y , $COOR_y$, $CONR_yR_z$, $CONR_yR_z$, NR_yR_z і
 NR_yCOR_z , де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6
атомів вуглецю;

R_{18} вибраний з водню, C_1 - C_6 -алкільної групи, що необов'язково може бути заміщена
15 щонайменше однією групою R_x , і фенільної групи, необов'язково заміщеної одним або
декількома замісниками R_x ;

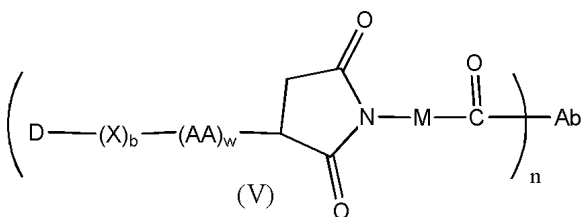
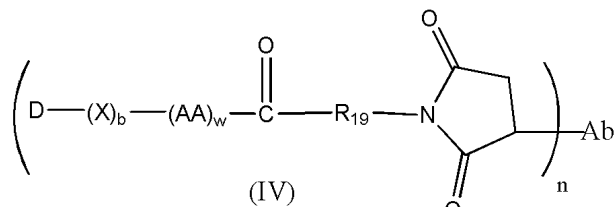
R_{27} являє собою атом водню або атом хлору;

кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує
потрійний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R_{25} , і атомом C, до якого приєднані R_{26} і
20 R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою антитіло
або його антигензв'язувальний фрагмент, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент
являє собою моноклональне антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракових
клітин, вірусними антигенами, антигенами клітин, що продукують аутоімунні антитіла, пов'язані з
25 аутоімунним захворюванням, мікробними антигенами, переважно моноклональне антитіло, що
імуноспецифічно зв'язується з антигенами ракової клітини; і

n являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]$, де L має значення, визначене у формулі (IV)
або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться
в діапазоні від 3 до 8.

30 4. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1, вибраний з формул (IV) і (V):

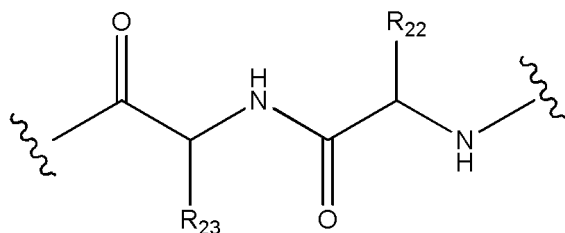


де:

R_{19} вибраний з - C_1 - C_6 -алкілену-, -фенілен- C_1 - C_6 -алкілену-, де феніленова група може бути
35 необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , вибраними з групи, що включає
алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів
вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, де кожний із зазначених вище алкіленових
замісників, окремо або приєднаний до іншої групи у вуглецевому ланцюзі, необов'язково може
бути заміщений одним або декількома замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні
40 групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю,
арильні групи, які містять від 6 до 12 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи,
переважно R_{19} являє собою C_1 - C_6 -алкіленову групу;

M являє собою - C_1 - C_3 -алкілен-(C_5 - C_7 -карбоцикло)-;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



(III)

де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до (X)_b, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

R_{22} вибраний з метилу, бензилу, ізопропілу, втор-бутилу і індолілметилу;

5 R₂₃ вибраний з метилу, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ і $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

Х являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-$, $-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-фенілен}-\text{NH}-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$, $-\text{COCH}_2\text{NH}-\text{COCH}_2\text{-NH}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-$ і $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$:

Д означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, де:

R₁ являє собою водень або метокси:

кожний з R_2 і R_3 являє собою водень;

R_3' являє собою водень:

кожний з R_5, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою водень;

кожний з R_4 і R_6 являє собою метил:

кожний з R_{11} і R_{13} являє собою водень;

R_{12} являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил;

кожний з R_{15} , R_{16} , R_{17} , R_{18} , R_{24} , R_{25} і R_{26} незалежно вибраний із групи, що складається з водню і C_1 - C_6 -алкільної групи, переважно водню і метилу;

R₁₈ вибраний з водню і фенілу, переважно водню;

R_{27} являє собою атом водню або атом хлору;

кожна пара атомів вуглецю, з'єднаних однією або декількома пунктирними лініями, зв'язана через подвійні зв'язки:

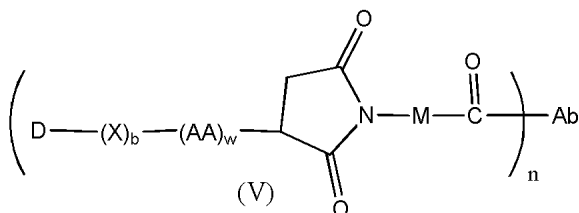
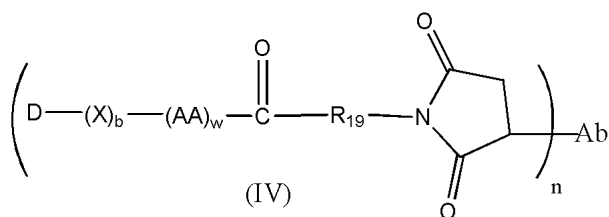
компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою моноклональне антитіло, вибране з групи, що включає Абциксимаб, Алемтузумаб, Базиліксимаб, Бевацизумаб, Цетуксимаб, Даклізумаб, Глембатумумаб, Гемтузумаб, Ібритутомаб, Інотузумаб, Лабетузумаб, Лорвотіузумаб, Мілатузумаб, Німотузумаб, Омалізумаб, Палівізумаб, Панітумумаб, Пінатузумаб, Ритуксимаб, Ворсетузумаб, Трастузумаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину, переважно антитіло, вибране з Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5.

5. Комп'югат лікарського засобу за пунктом 4, де компонент Ab, що містить щонайменше один антиген зв'язувальний сайт, вибраний з Трастузумабу, Ритуксимабу і анти-CD4 антитіла або їх імунологічно активної частини.

6. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 4, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.

7. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1, вибраний з формул (IV) і (V):

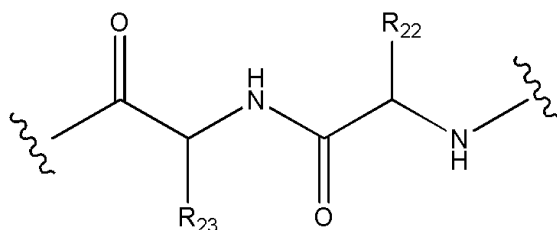


де:

R_{19} являє собою $-C_3-C_6$ -алкілен-;

5 M являє собою $-C_1-C_3$ -алкілен- $(C_5-C_7$ -карбоцикло)-;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою групу формули (III):

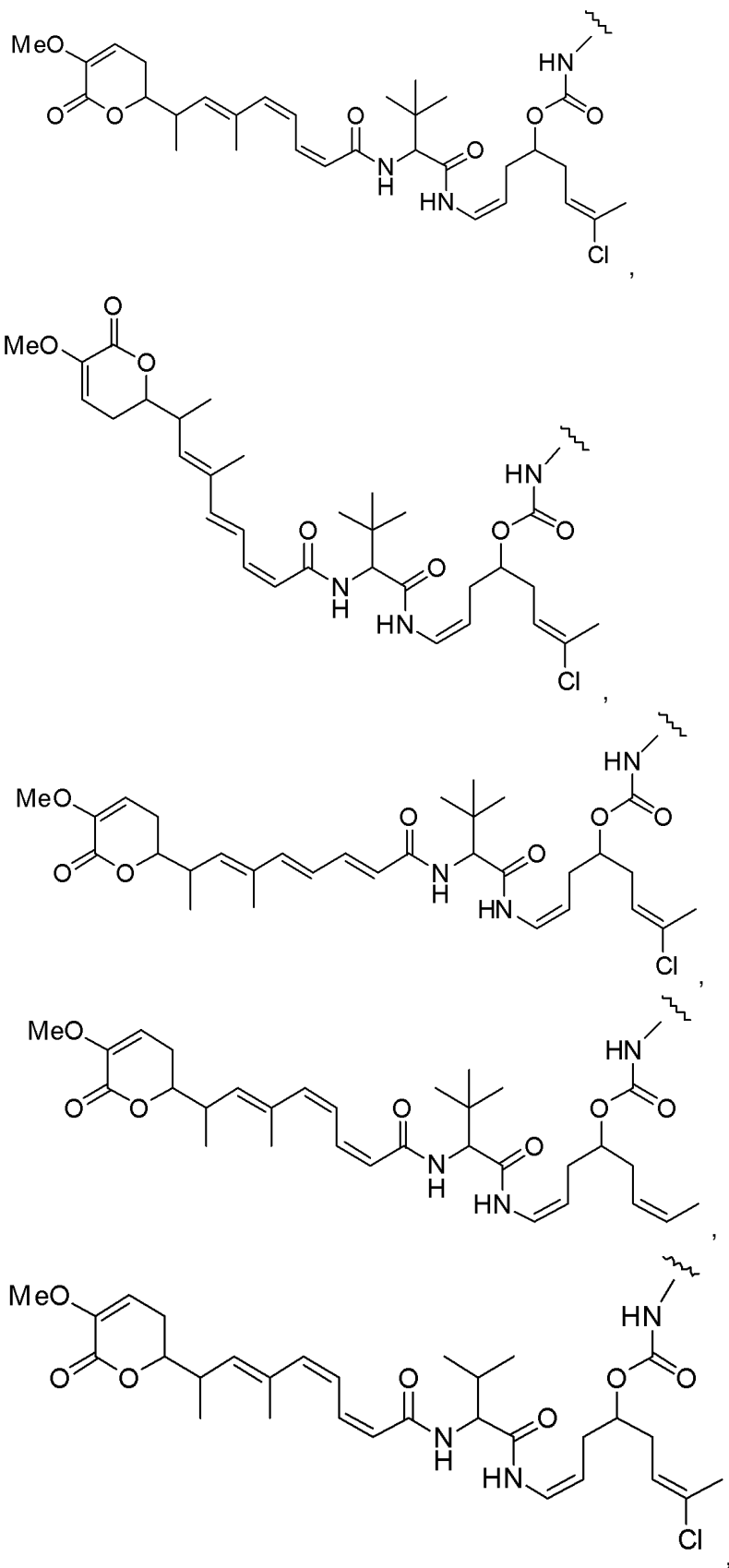


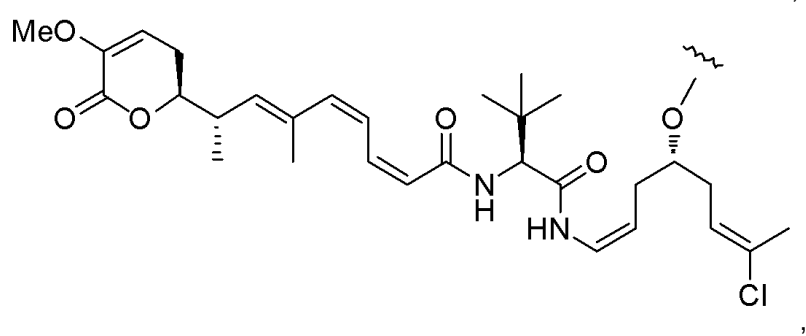
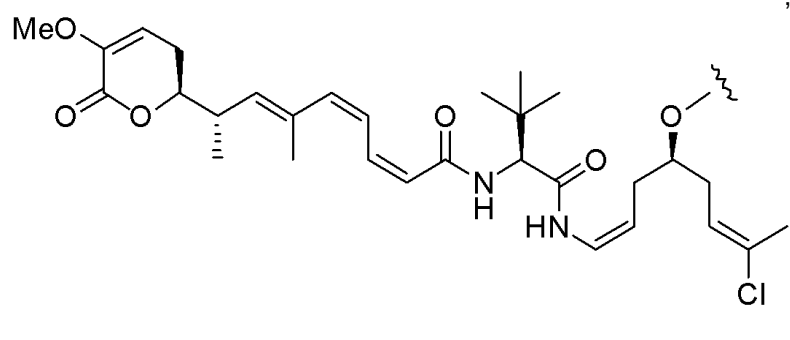
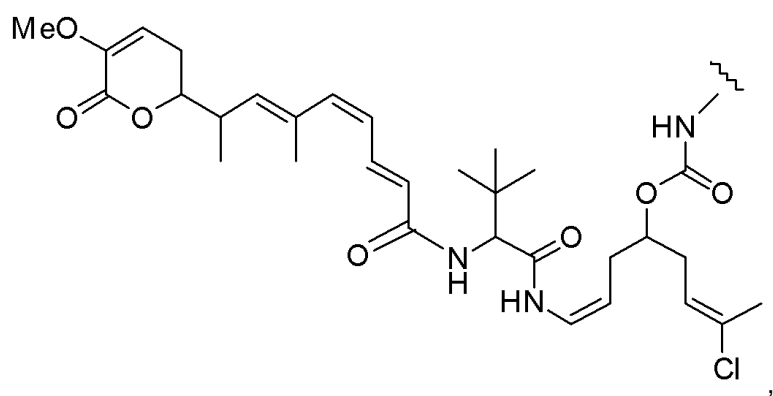
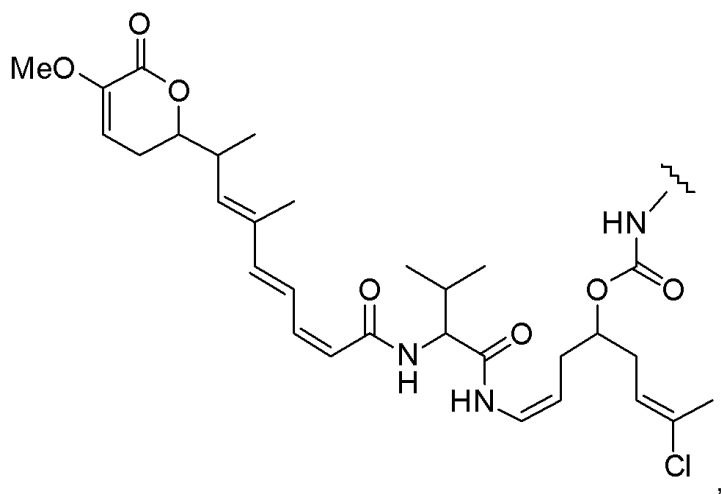
(III)

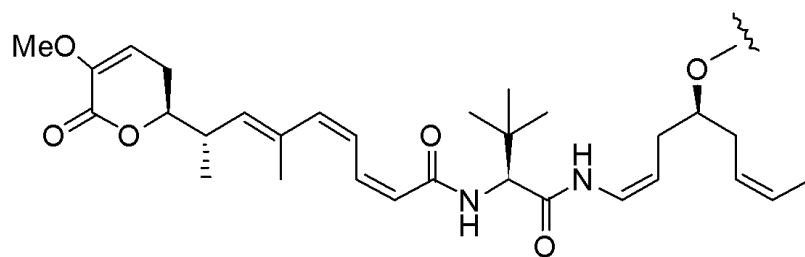
де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-$, $-COO-CH_2$ -фенілен- $NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-COO-CH_2$ -(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $NH-$, $-COCH_2NH-COCH_2-NH-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $S-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_3$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NHCO(C_1-C_3$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $S-$, $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-$ і $-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-COO-CH_2$ -(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $NH-$;

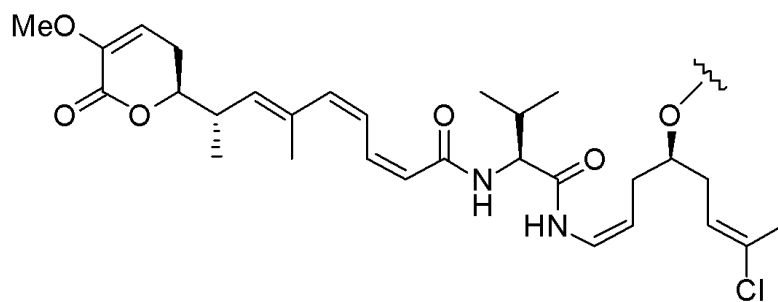
25 D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з наступної групи:



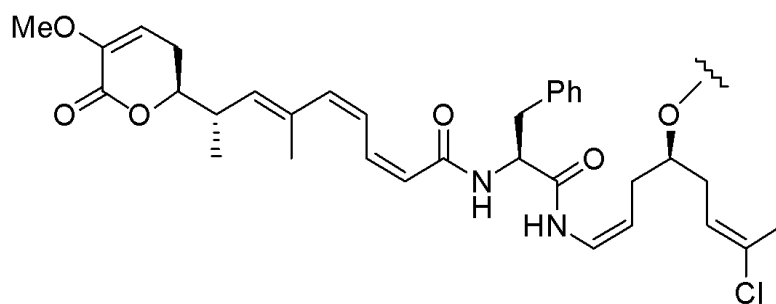




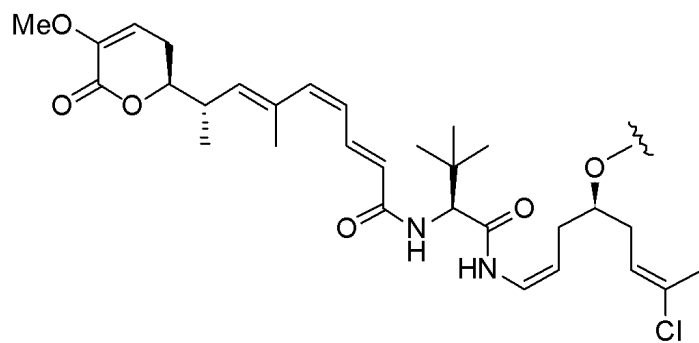
,



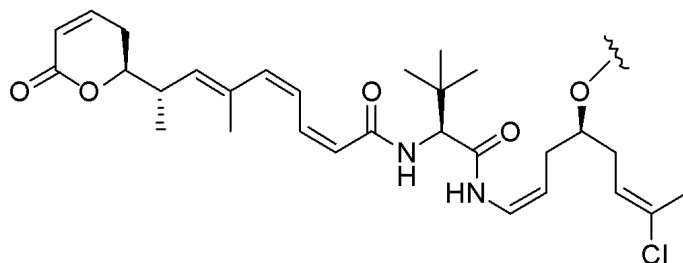
,



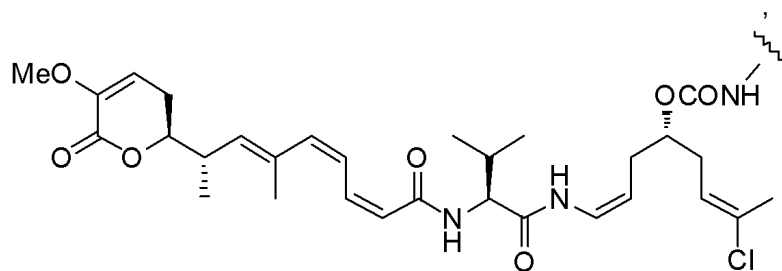
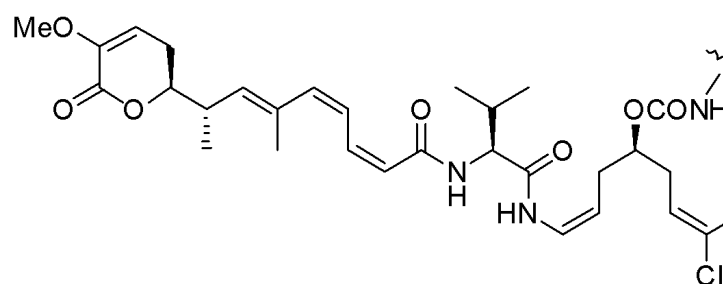
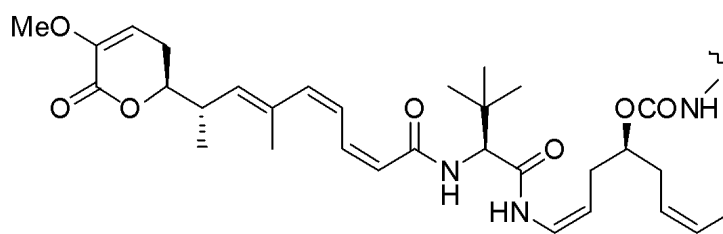
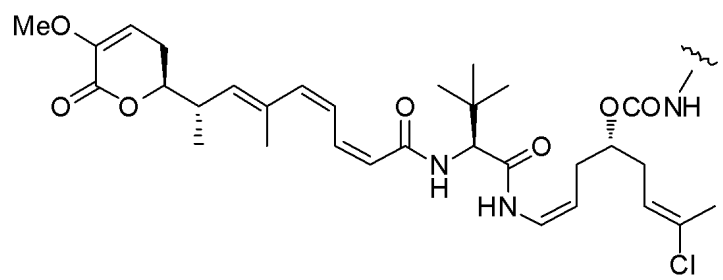
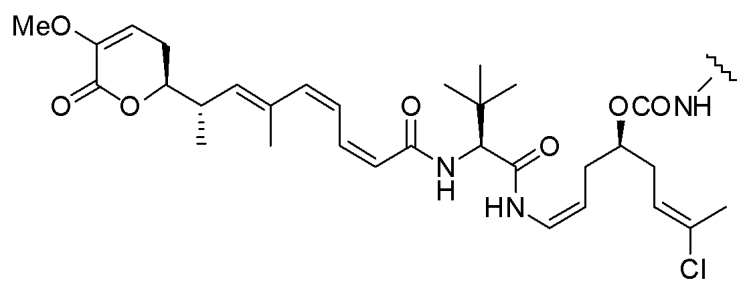
,



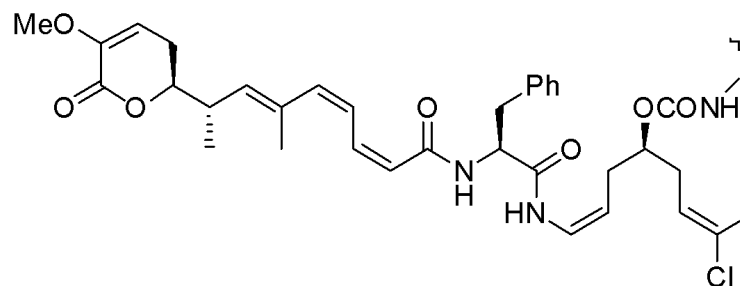
,

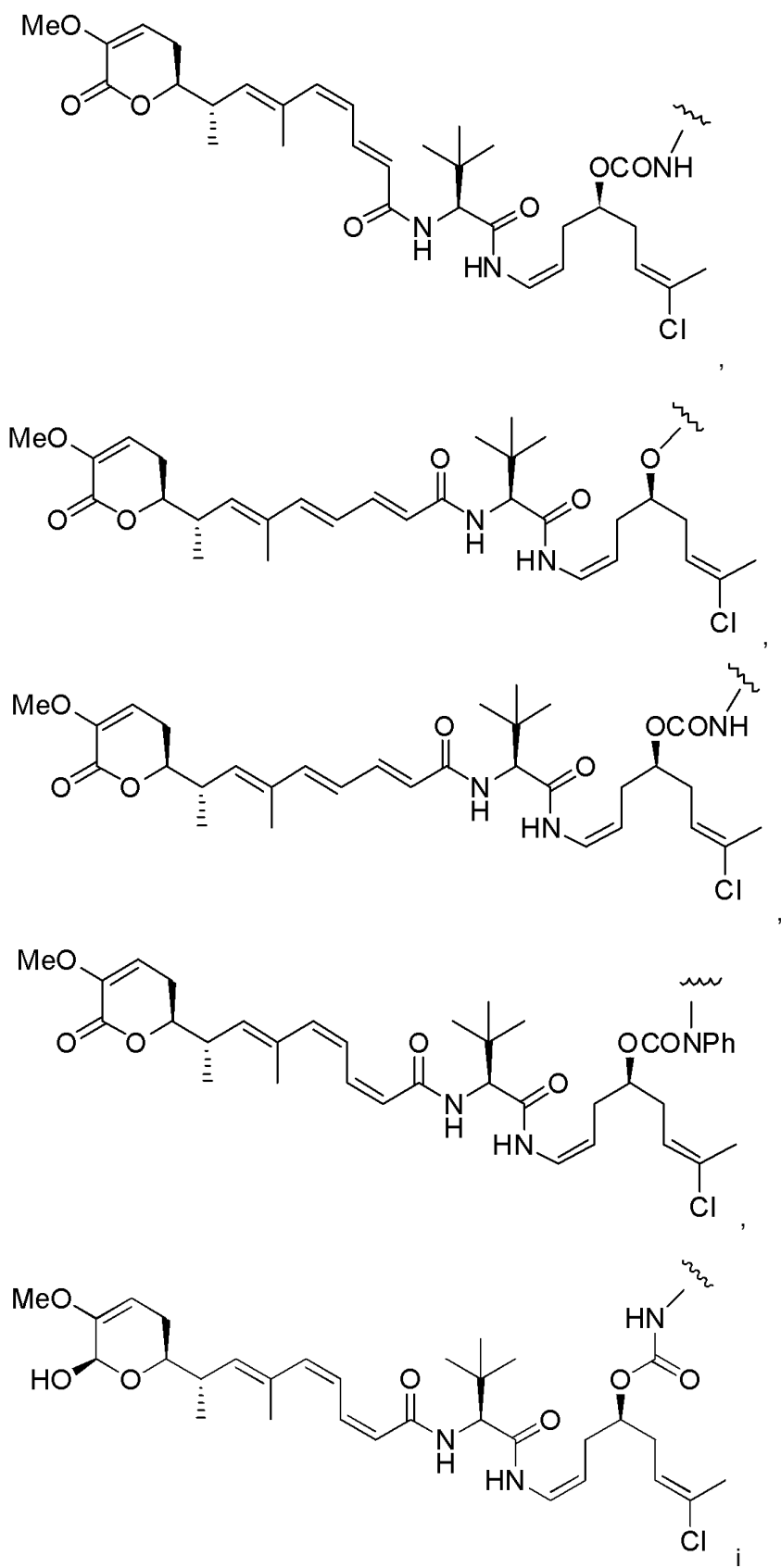


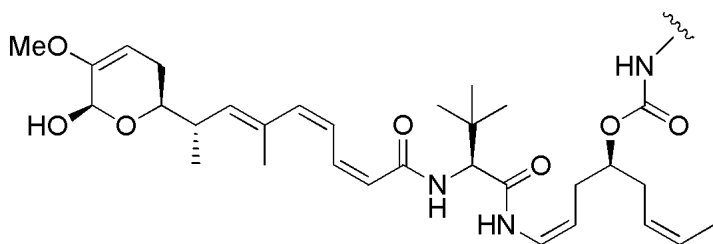
,



5







де хвилясті лінії вказують місце ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

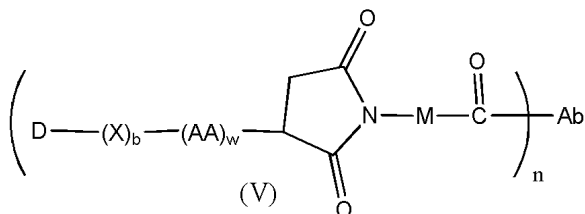
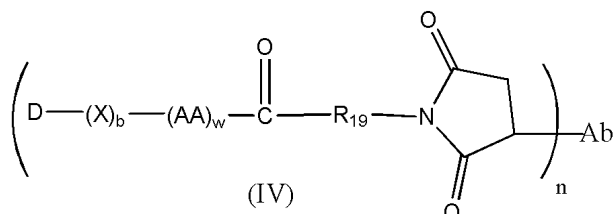
5 компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або їх імунологічно активної частини; і

p являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5.

10 8. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 7, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини.

9. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 7, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.

15 10. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1, вибраний з формул (IV) і (V):

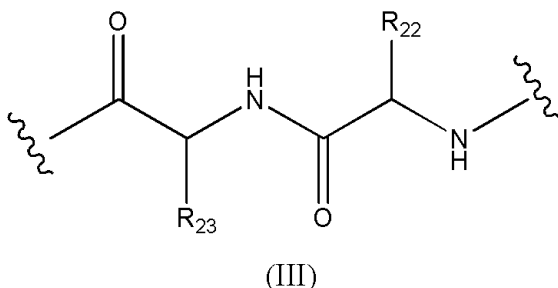


де:

R_{19} являє собою $-C_3-C_6$ -алкілен-;

20 M являє собою $-C_1-C_3$ -алкілен- $(C_5-C_7$ -карбоцикло)-;

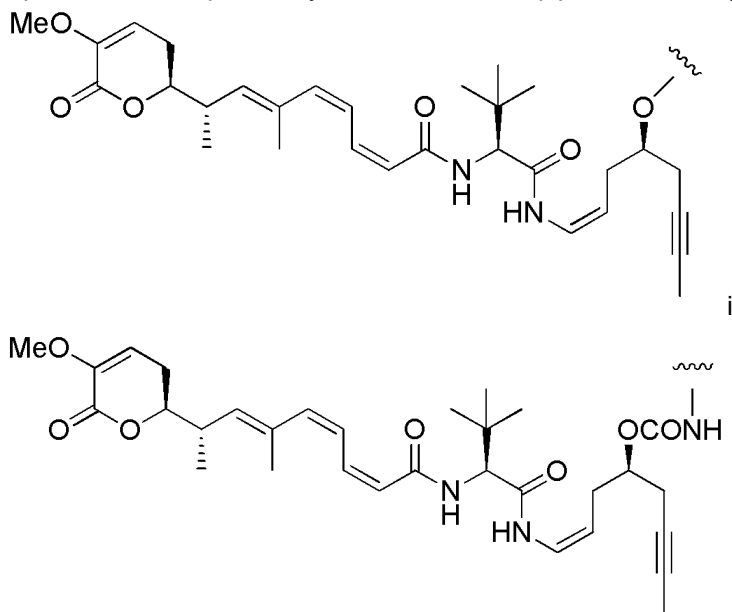
w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою групу формули (III):



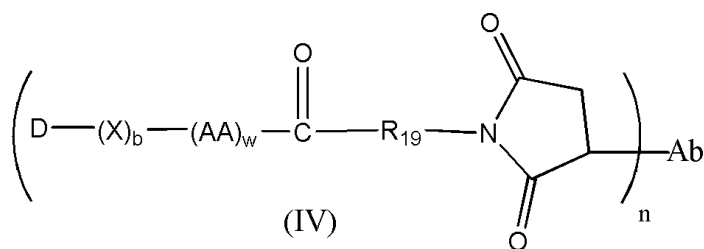
де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч);

25 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен) $NH-$, $-COO-CH_2$ -фенілен- $NH-$, де зазначена феніленова група може бути необов'язково заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1

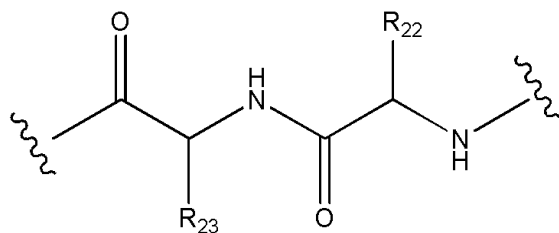
до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$, $-\text{COCH}_2\text{NH}-\text{COCH}_2\text{NH}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-\text{CONH}-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NHCO}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{S}-$, $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-$ і $-(\text{C}_2-\text{C}_4\text{-алкілен})\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)- $\text{NH}-$;
D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



- де хвилясті лінії вказують місце ковалентного приєднання до $(\text{X})_b$, якщо це має місце, або до $(\text{AA})_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;
компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб, Ритуксимаб, анти-CD4 антитіло, анти-CD5 антитіло й анти-CD13 антитіло або його імунологічно активну частину; і
п являє собою відношення групи $[\text{D}-(\text{X})_b-(\text{AA})_w-(\text{L})]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5.
11. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 10, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний з Трастузумабу, Ритуксимабу і анти-CD4 антитіла або їх імунологічно активної частини.
12. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 10, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.
13. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1 формули (IV):



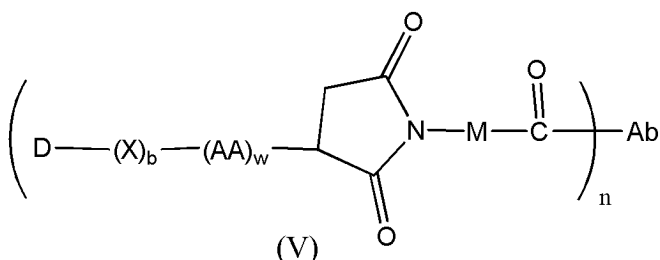
- де:
 R_{19} являє собою $-\text{C}_5\text{-алкілен}-$;
b має значення 1;
w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(\text{AA})_w$ являє собою групу формули (III):



(III)

де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

- 5 X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-CONH(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен- $NH-$ і $-CONH(CH_2)_3NH-$; або групи, що має формулу (V)



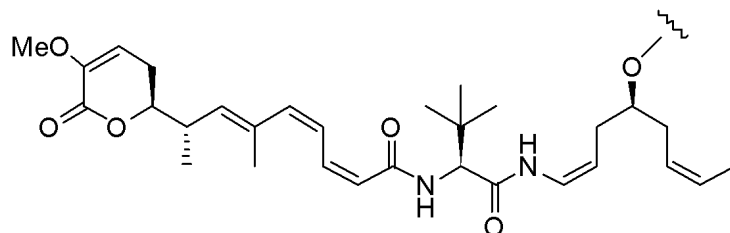
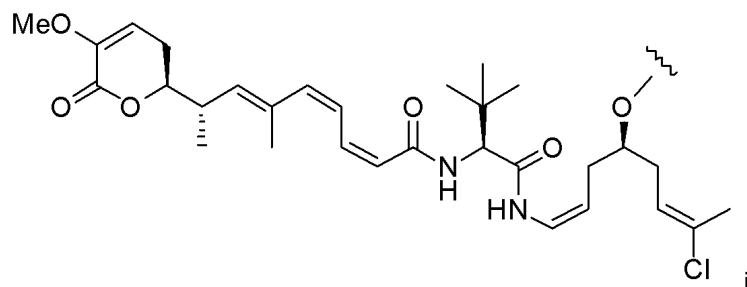
де M являє собою -метилциклогексиле-;

b має значення 1;

- 10 w має значення 0; і

X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-CONH(CH_2)_3-S-$ і $-CONH(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S-$;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



- 15

де хвилясті лінії вказують місце ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або $(AA)_w$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

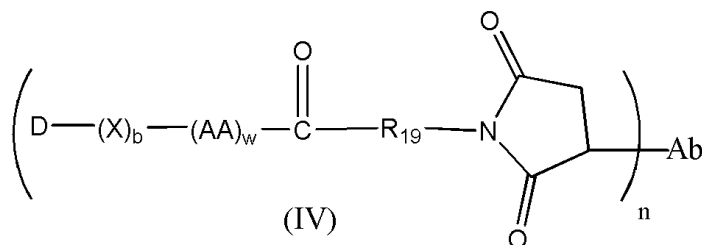
- 20

n являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4.

14. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 13, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини.

15. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 13, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.

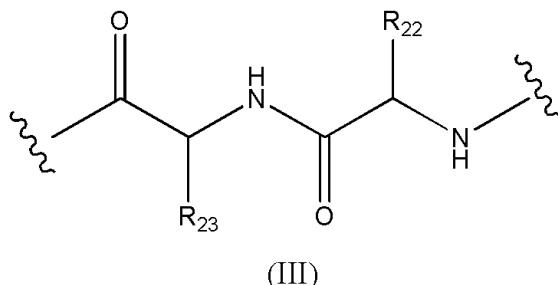
16. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 1 формули (IV):



де R_{19} являє собою $-C_5$ -алкілен-;

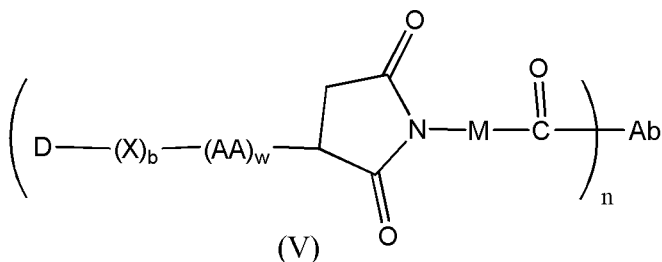
b має значення 1;

10 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою формулу (III):



де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, і хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до $(X)_b$, якщо це має місце, або до групи лікарського засобу (хвиляста лінія ліворуч) і до лінкера (хвиляста лінія праворуч); і

15 X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH- і $-(CH_2)_3NH$ -; або групи, що має формулу (V)



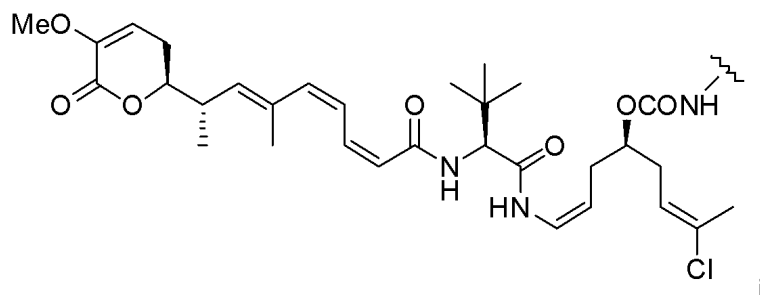
де M являє собою -метилциклогексилен-;

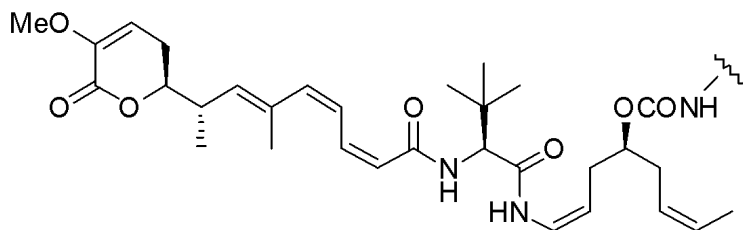
b має значення 1;

20 w має значення 0; і

X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-(CH_2)_3S$ - і $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$;

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:





де хвилясті лінії вказують місце ковалентного приєднання до $(X)_b$, якщо це має місце, або до $(AA)_{w_1}$, якщо це має місце, або до лінкерної групи L;

компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

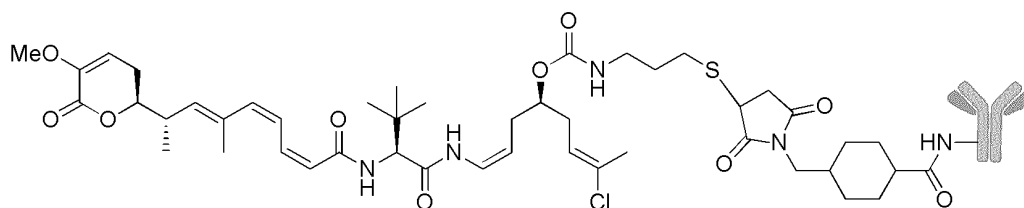
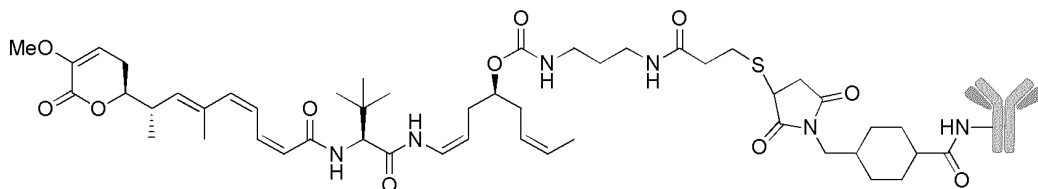
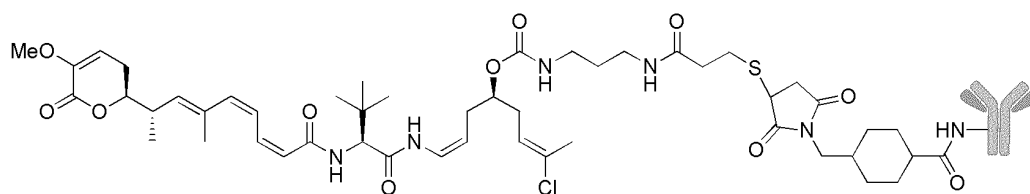
5 Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини; і

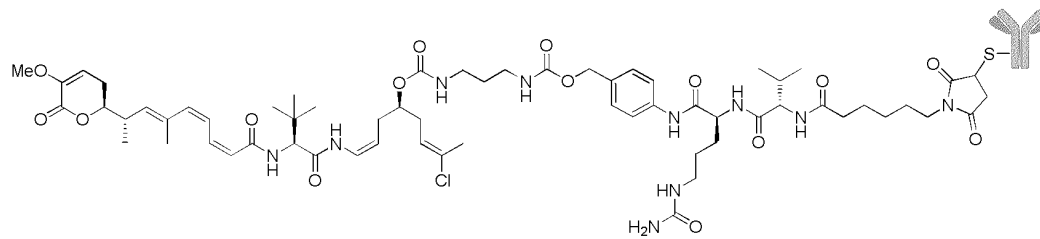
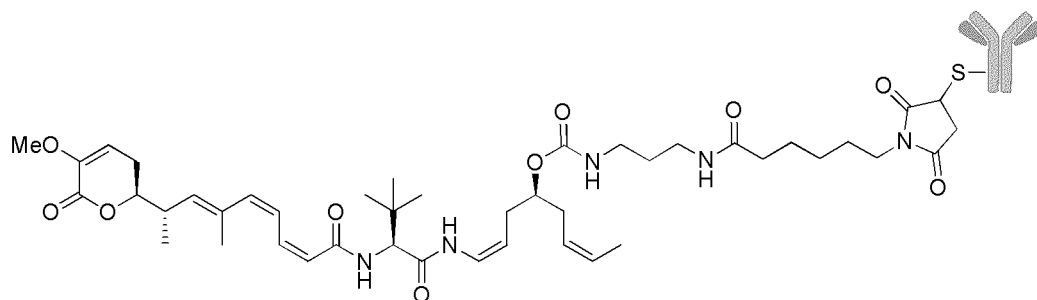
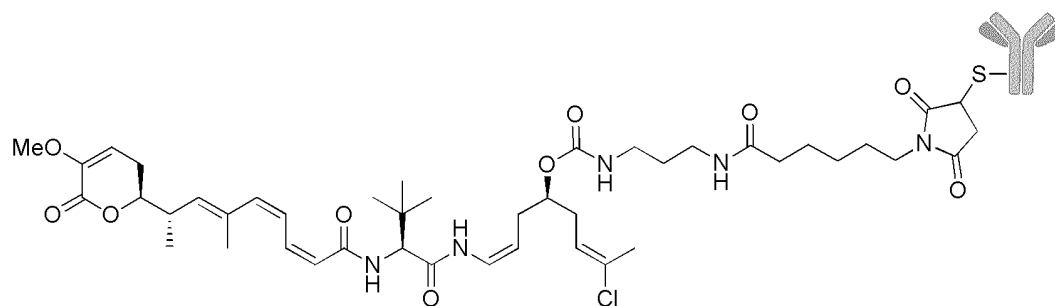
п являє собою відношення групи $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$, де L має значення, визначене у формулі (IV) або (V), до компонента, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, і знаходиться в діапазоні від 3 до 5, переважно 4.

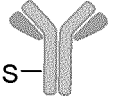

10 17. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 16, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини.

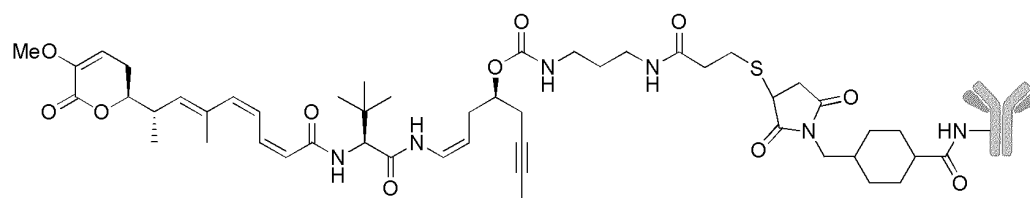
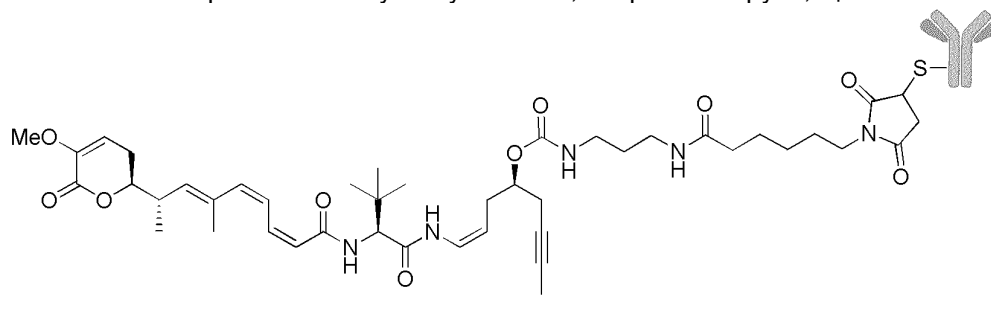
18. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 16, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.

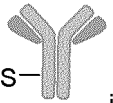

15 19. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за пунктом 13, вибраний із групи, що включає:



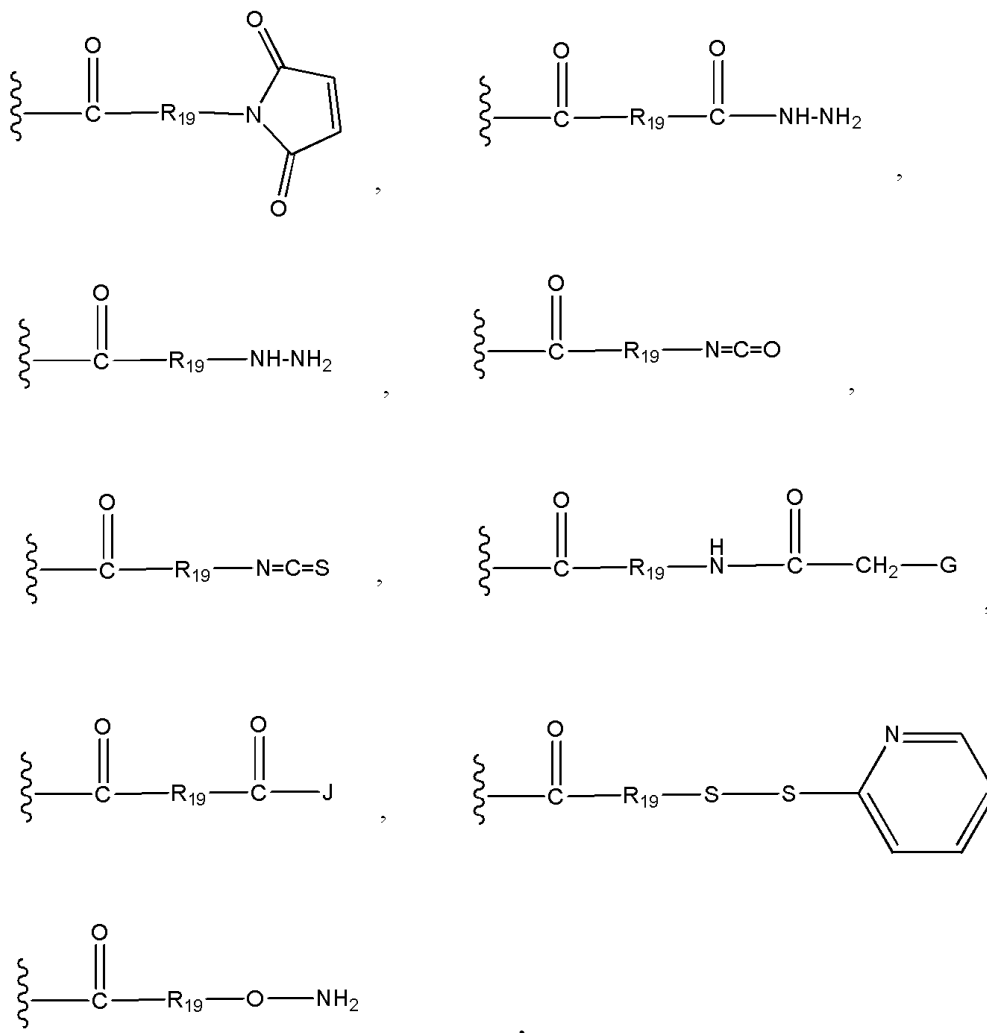


- 5 де кожний з  і  вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини.
20. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 10, вибраний із групи, що включає:



- 10 де кожний з  і  вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу, анти-CD4 антитіла, анти-CD5 антитіла й анти-CD13 антитіла або його імунологічно активної частини.

21. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 19 або пунктом 20, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, вибраний із Трастузумабу, Ритуксимабу й анти-CD4 антитіла або його імунологічно активної частини.
22. Кон'югат лікарського засобу за пунктом 19 або пунктом 20, де компонент Ab, що містить щонайменше один антигензв'язувальний сайт, являє собою Трастузумаб або його імунологічно активну частину.
23. Сполука формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H, де:
- L₁ являє собою лінкер, вибраний із групи формул, що включає:



- 10 де кожна з хвилястих ліній вказує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до X;
G вибраний з галогену, -О-мезилу і -О-тозилу;
J вибраний з галогену, гідрокси, -N-сукцинімідокси, -О-(4-нітрофенілу), -О-пентафторфенілу, -О-тетрафторфенілу і -О-C(O)-OR₂₀;
- 15 R₁₉ вибраний з -C₁-C₁₂-алкілену-, -C₃-C₈-карбоцикло-, -О-(C₁-C₁₂-алкілену), -C₆-C₁₈-арилу в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-C₆-C₁₈-арилу-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₆-C₁₈-арилу-C₁-C₁₂-алкілену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₃-C₈-карбоцикло)-, -(C₃-C₈-карбоцикло)-C₁-C₁₂-алкілену-, -C₅-C₁₄-гетероцикло-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x, -C₁-C₁₂-алкілен-(C₅-C₁₄-гетероцикло)-, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або

декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки у зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(C_5-C_{14}\text{-гетероцикло})-C_1-C_{12}\text{-алкілену-}$, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить

щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(OCH_2CH_2)_r$ і $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, необов'язково може бути заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

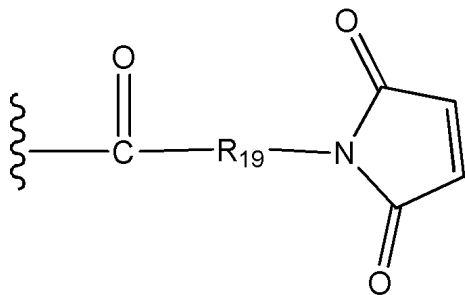
R_{20} являє собою C_1-C_{12} -алкіл або арильну групу, що містить від 6 до 18 атомів вуглецю в одному або декількох ароматичних кільцях, при цьому зазначені арильні групи необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x ;

r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 10; і

кожний з D, X, AA і w має значення, визначене в будь-якому одному з пунктів 1-22.

24. Сполука формули $D-X-(AA)_w-L_1$ або формули $D-X-(AA)_w-H$ за пунктом 23, де:

L_1 являє собою лінкер формули:



де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;

R_{19} вибраний з $-C_1-C_{12}\text{-алкілену-}$, $-O-(C_1-C_{12}\text{-алкілену})$, $-C_6-C_{12}\text{-арилу}$ в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}\text{-алкілен-}C_6-C_{12}\text{-арилу-}$, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_6-C_{12}\text{-арилу-}C_1-C_{12}\text{-алкілену-}$, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть

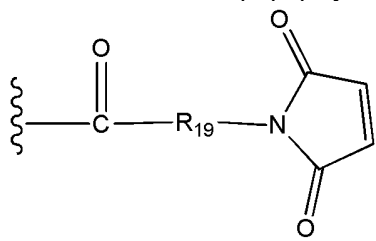
бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_5-C_{12}\text{-гетероцикло-}$, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-C_1-C_{12}\text{-алкілен-}(C_5-C_{12}\text{-гетероцикло})$, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(C_5-C_{12}\text{-гетероцикло})-C_1-C_{12}\text{-алкілену-}$, де зазначена гетероциклогрупа може являти собою насичену або ненасичену групу, яка містить одне або декілька кілець і містить щонайменше один атом кисню, азоту або сірки в зазначеному кільці (кільцях), при цьому зазначена група необов'язково заміщена одним або декількома замісниками R_x , $-(OCH_2CH_2)_r$ і $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r$, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, необов'язково може бути заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

r являє собою ціле число, що має значення від 1 до 6; і

кожний з D, X, AA і w має значення, визначене в будь-якому одному з пунктів 1-22.

25. Сполука формули $D-X-(AA)_w-L_1$ або формули $D-X-(AA)_w-H$ за пунктом 23, де:

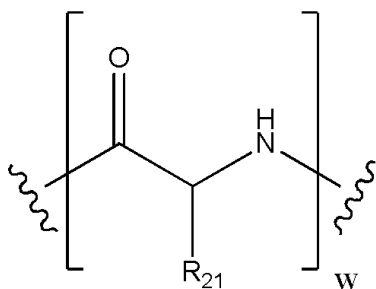
L_1 являє собою лінкер формули:



де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;
 R_{19} вибраний з $-C_1-C_8$ -алкілену-, $-O-(C_1-C_8$ -алкілену), $-C_1-C_8$ -алкілен- C_6-C_{12} -арилену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , $-C_6-C_{12}$ -арилен- C_1-C_8 -алкілену-, де ариленова група представлена в одному або декількох кільцях, що можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома замісниками R_x , де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, або окремо, або приєднаний до іншого фрагмента вуглецевого ланцюга, необов'язково може бути заміщений одним або декількома замісниками R_x ;

$(AA)_w$ являє собою формулу (II):



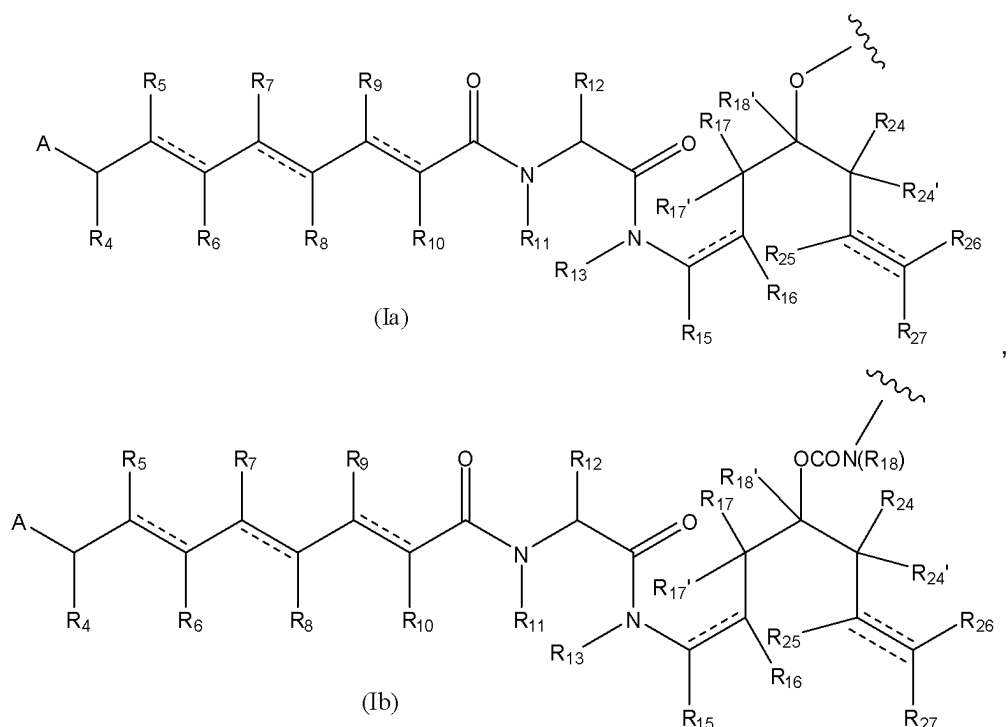
(II)

де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

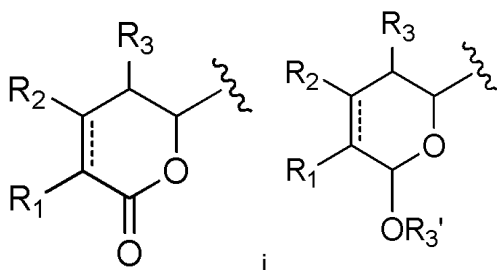
де R_{21} у кожному випадку вибраний із групи, що включає водень, метил, ізопропіл, втор-бутил, бензил, індолілметил, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ і $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, і w являє собою ціле число, що має значення від 0 до 6;

X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH-, $-COO-CH_2$ -фенілен-NH-, де зазначена феніленова група необов'язково може бути заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $COO-CH_2$ -(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи)-NH-, $-COCH_2NH-COCH_2-NH-$, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-CONH-(C_2-C_4$ -алкілен)NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NHCO(C_1-C_3 -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)S-, $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- і $-(C_2-C_4$ -алкілен)NH- $COO-CH_2$ -(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-; і

D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:



де хвилясті лінії у формулах (Ia) і (Ib) указують місце ковалентного приєднання до X;
A вибраний з



де хвилясті лінії групи A вказують місце ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

R₁ вибраний з водню, OR_a і OCOR_a, де R_a вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

10 R₂ і R₃, кожен незалежно, вибрані з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

R₃' вибраний з водню, COR_a і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де R_a являє собою заміщений або незаміщений C₁-C₆-алкіл, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

15 кожний з R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ і R₁₂ незалежно вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

кожний з R₁₁ і R₁₃ незалежно вибраний з водню і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

20 кожний з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₇', R₁₈', R₂₄, R₂₄', R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що включає: водень і заміщені або незаміщені C₁-C₆-алкільні групи, де необов'язкові замісники вибрані з групи, що включає алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, гідроксильні групи, оксогрупи, атоми галогену, OCOR_y, OCOOR_y, COR_y, COOR_y, OCONR_yR_z, CONR_yR_z, NR_yR_z і NR_yCOR_z, де кожний з R_y і R_z вибраний з атомів водню й алкільних груп, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю;

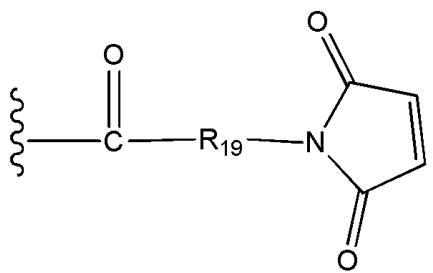
25 R₁₈ вибраний з водню, C₁-C₆-алкільної групи, що необов'язково може бути заміщена щонайменше однією групою R_x, і фенільної групи, необов'язково заміщеної одним або декількома замісниками R_x;

30 R₂₇ вибраний з водню, галогену і заміщеного або незаміщеного C₁-C₆-алкілу, де необов'язкові замісники являють собою один або декілька замісників R_x;

і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує потрібний зв'язок між атомом С, до якого приєднаний R_{25} , і атомом С, до якого приєднані R_{26} і R_{27} , тоді R_{25} і або R_{26} , або R_{27} відсутні.

26. Сполука формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H за пунктом 23, де:

5 L₁ являє собою групу формули:



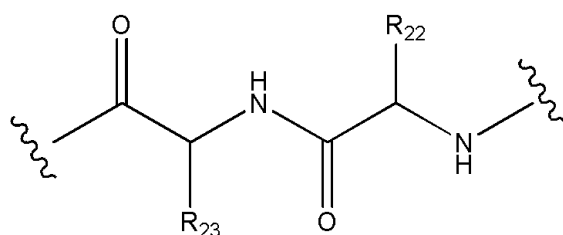
де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до (AA)_w, якщо це має місце, або до Х;

10 R₁₉ вибраний з -C₁-C₆-алкілену-, фенілен-C₁-C₆-алкілену-, де феніленова група необов'язково може бути заміщена одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, де кожний із зазначених вище алкіленових замісників, окремо або приєднаний до іншої групи у вуглецевому ланцюзі, необов'язково може

15 бути заміщений одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, арилні групи, які містять від 6 до 12 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи і ціаногрупи, і переважно R₁₉ являє собою C₁-C₆-алкіленову групу;

w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді (AA)_w являє собою групу формули (III):



(III)

20 де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до Х (хвиляста лінія ліворуч) і до L₁ або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

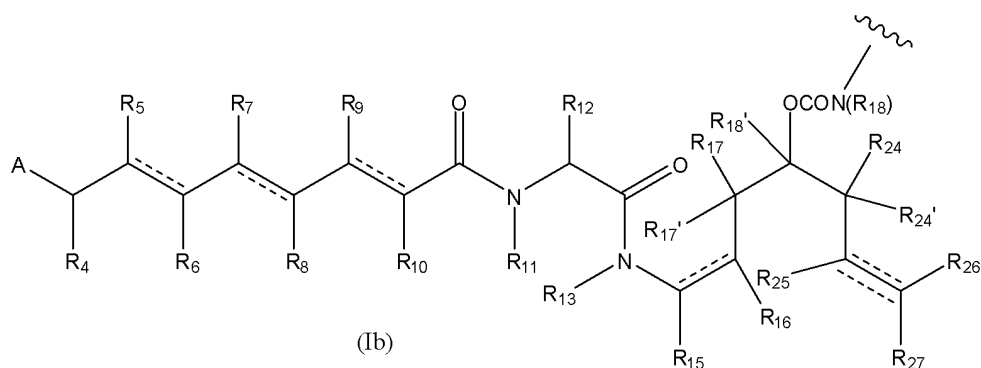
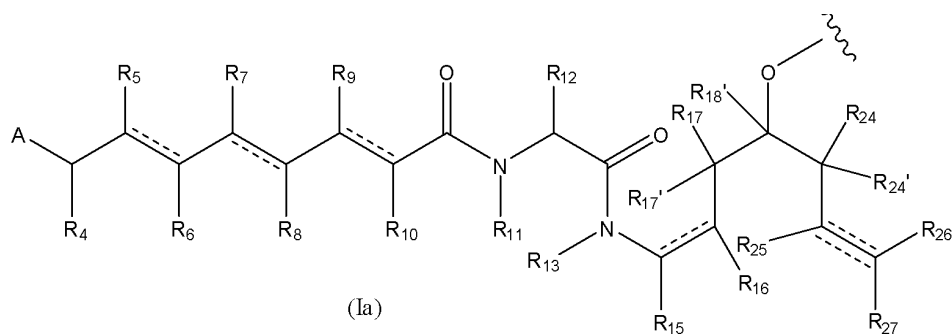
R₂₂ вибраний з метилу, бензилу, ізопропілу, втор-бутилу і індолілметилу;

R₂₃ вибраний з метилу, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₃NHCONH₂ і -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂;

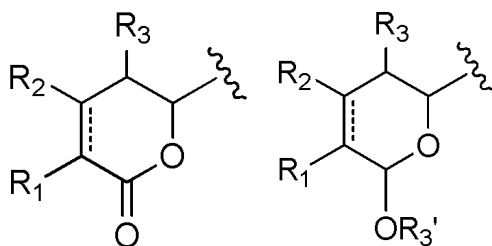
25 Х являє собою розширювальну групу, вибрану з -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NH-, -CONH(C₂-C₄-алкілен)NHCOO-CH₂-(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним або декількома замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)S-, -CONH-(C₂-C₄-алкілен)NHCO-(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NHCO(C₁-C₃-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)S-, -(C₂-C₄-алкілен)NH- і -(C₂-C₄-алкілен)NH-

30 COO-CH₂-(фенілен, що необов'язково може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x, вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-; і

35 D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер:



де хвилясті лінії у формулах (Ia) і (Ib) вказують місце ковалентного приєднання до X;
A вибраний з



5

де хвилясті лінії групи A вказують місце ковалентного приєднання до іншої частини групи лікарського засобу;

R₁ являє собою водень або метокси;

кожний з R₂ і R₃ являє собою водень;

10 R_{3'} являє собою водень;

кожний з R₅, R₇, R₈, R₉ і R₁₀ являє собою водень;

кожний з R₄ і R₆ являє собою метил;

R₁₂ являє собою ізопропіл, трет-бутил або бензил;

кожний з R₁₁ і R₁₃ являє собою водень;

15 кожний з R₁₅, R₁₆, R₁₇, R_{17'}, R_{18'}, R₂₄, R_{24'}, R₂₅ і R₂₆ незалежно вибраний із групи, що складається з водню і C₁-C₆-алкільної групи, переважно водню і метилу;

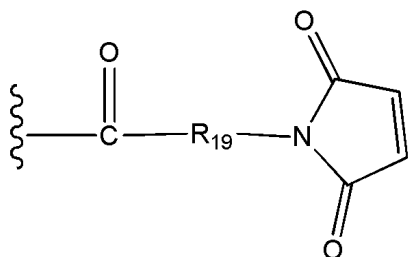
R₁₈ вибраний з водню і фенілу, переважно водню;

R₂₇ являє собою водень або галоген;

і кожна пунктирна лінія являє собою необов'язковий додатковий зв'язок, але, коли існує
20 потрібний зв'язок між атомом C, до якого приєднаний R₂₅, і атомом C, до якого приєднані R₂₆ і R₂₇, тоді R₂₅ і або R₂₆, або R₂₇ відсутні.

27. Сполука формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H за пунктом 23, де:

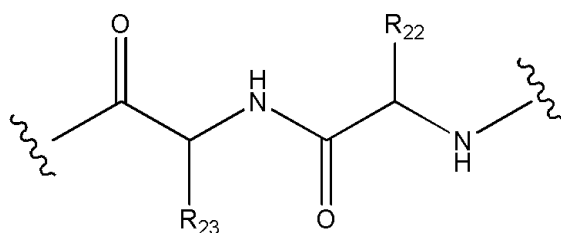
L₁ являє собою лінкер формули:



де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;
 R_{19} являє собою $-C_3-C_6$ -алкілен-;

5 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою групу формули (III):

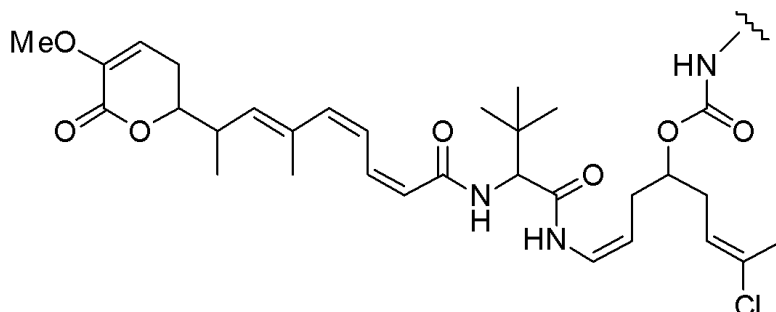


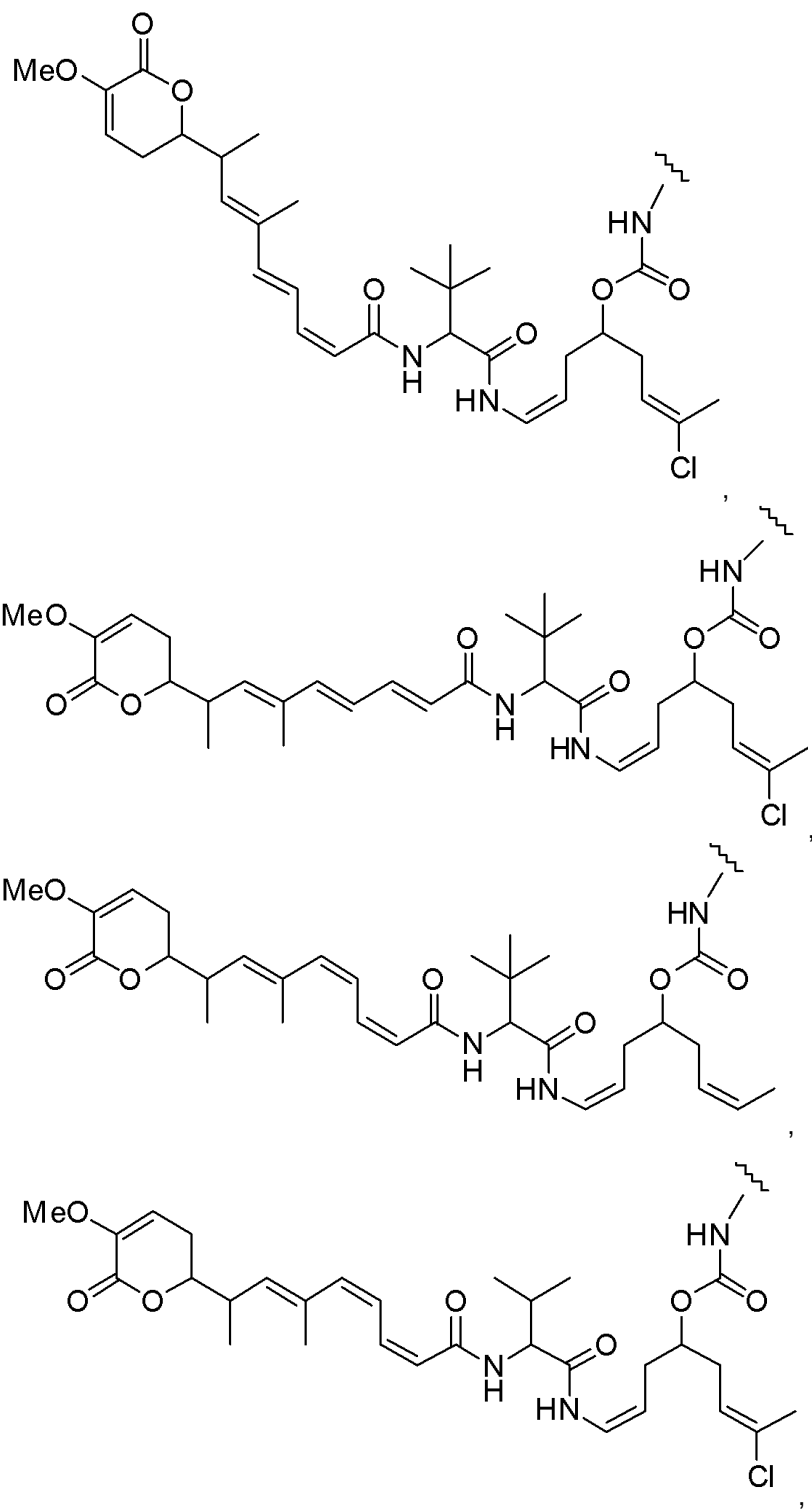
(III)

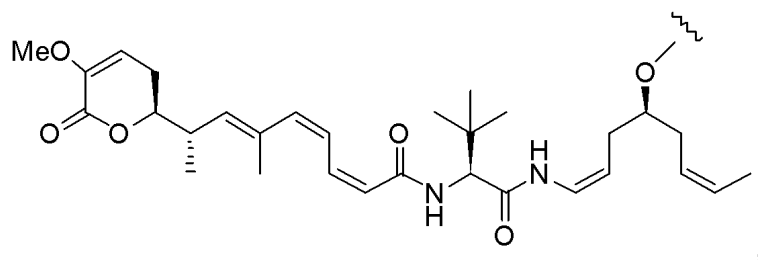
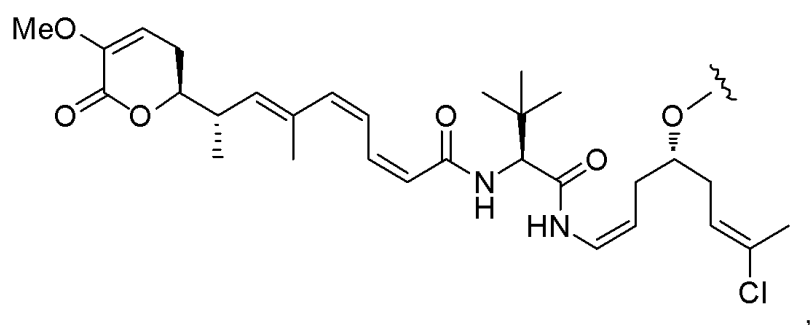
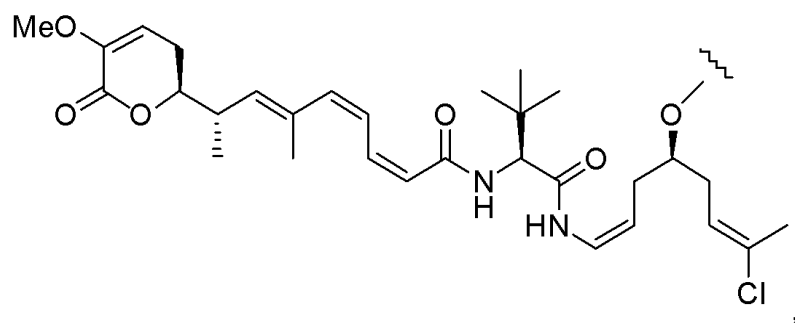
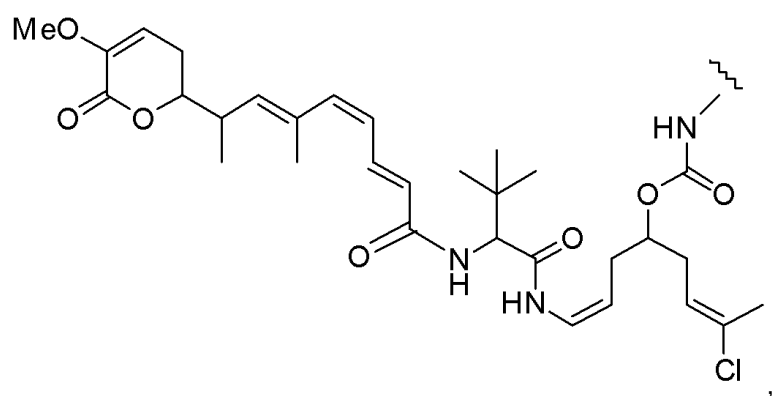
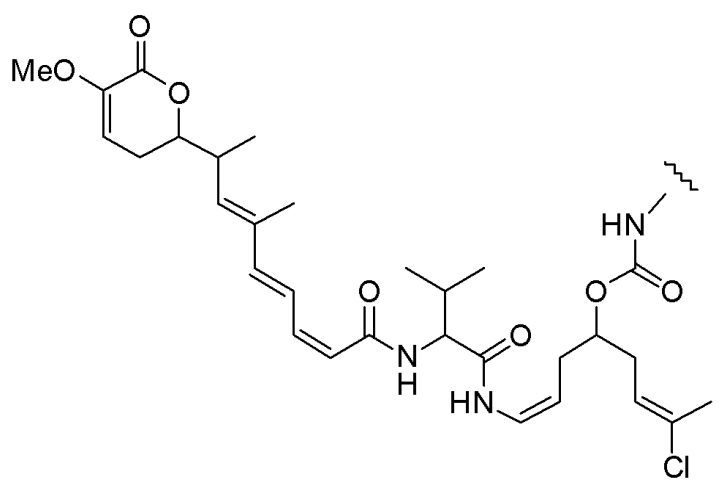
R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

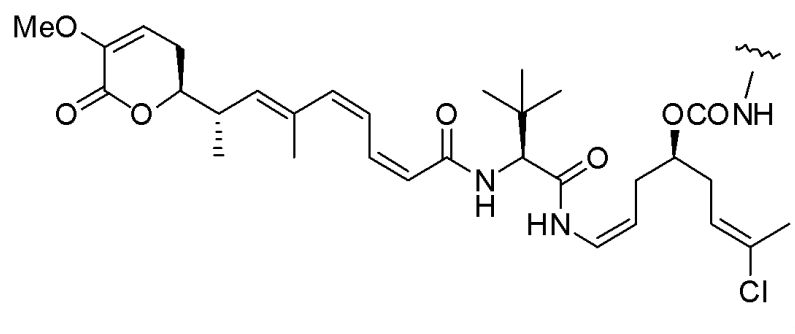
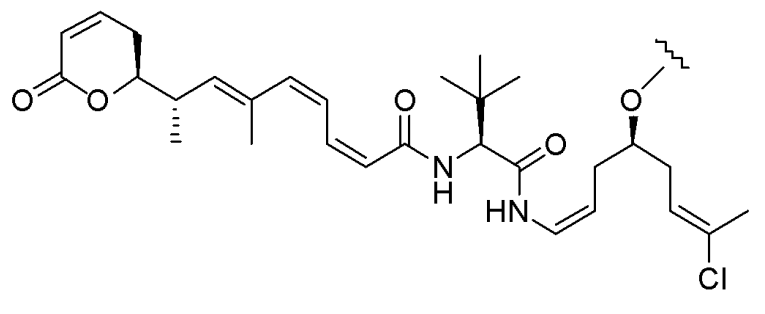
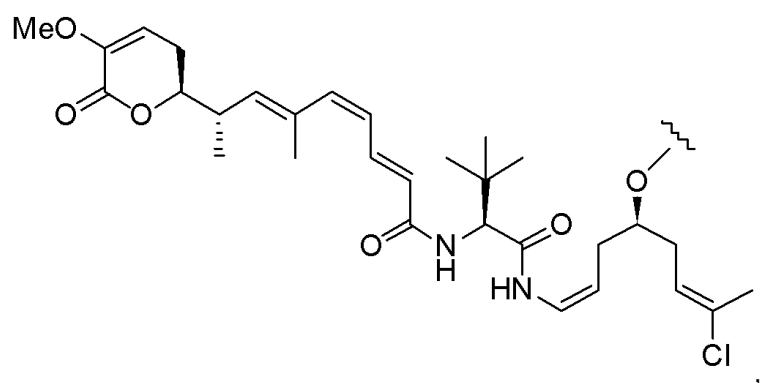
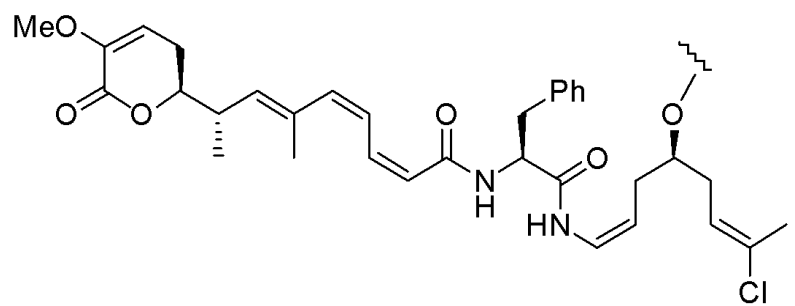
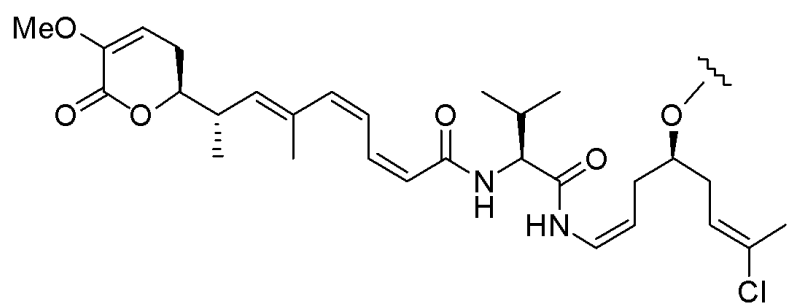
10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з групи, що включає $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$, $-COO-CH_2\text{-фенілен}-NH-$, де зазначена феніленова група необов'язково може бути заміщена одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково
 15 може бути заміщений одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-CONH-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NHCO(C_1-C_3\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})S-$, $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-$ і $-(C_2-C_4\text{-алкілен})NH-COO-CH_2\text{-(фенілен)}$, що необов'язково може бути заміщений
 20 одним-чотирма замісниками R_x , вибраними з групи, що включає алкільні групи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, алкоксигрупи, які містять від 1 до 6 атомів вуглецю, атоми галогену, нітрогрупи або ціаногрупи)-NH-; і

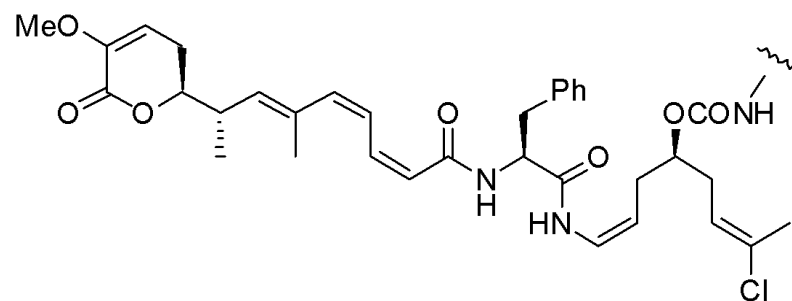
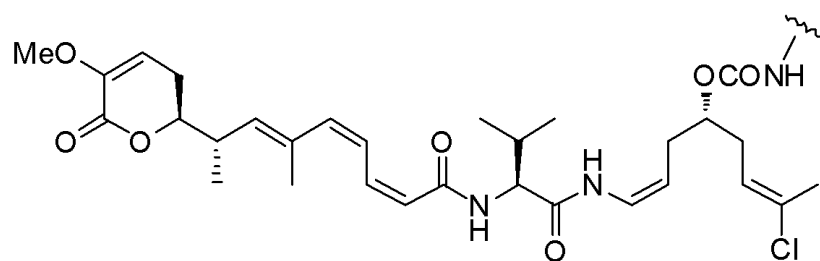
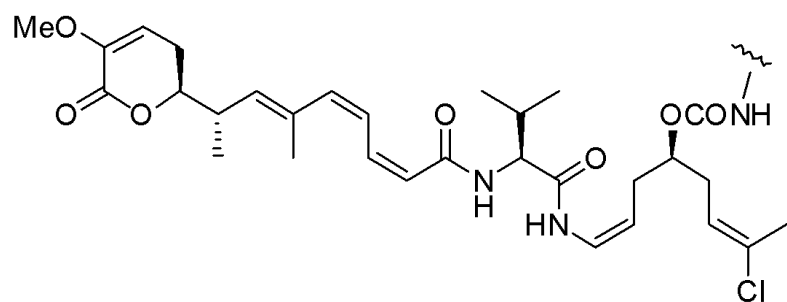
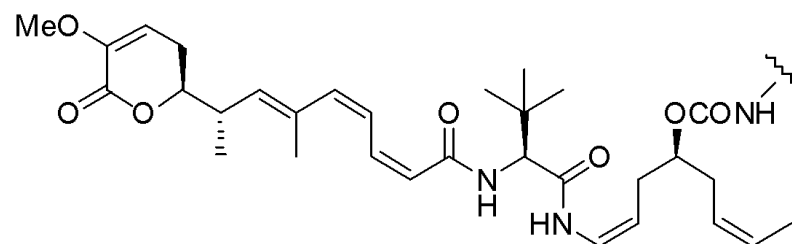
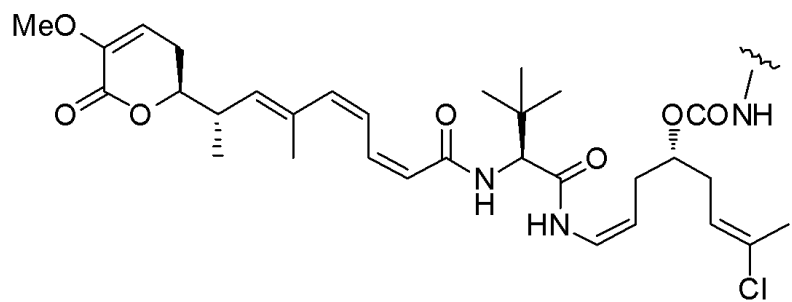
D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або формули (Ib) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з
 25 наступної групи:

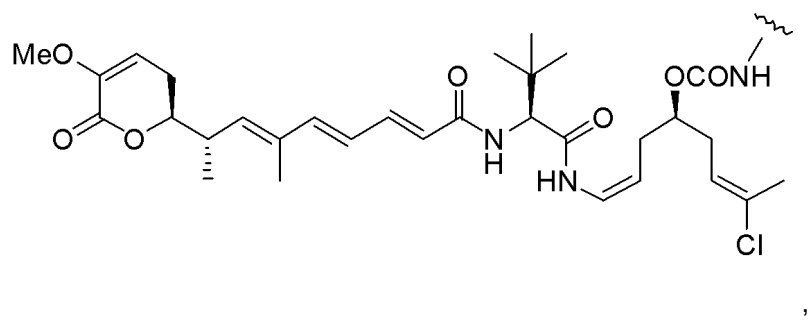
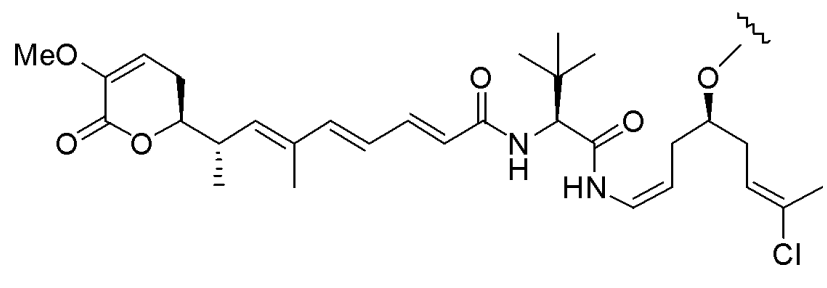
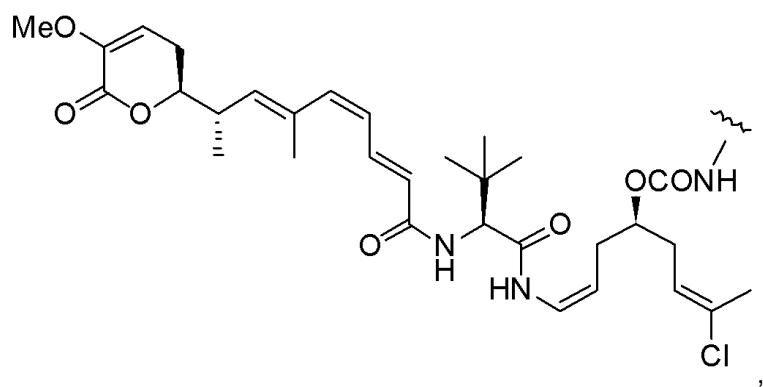


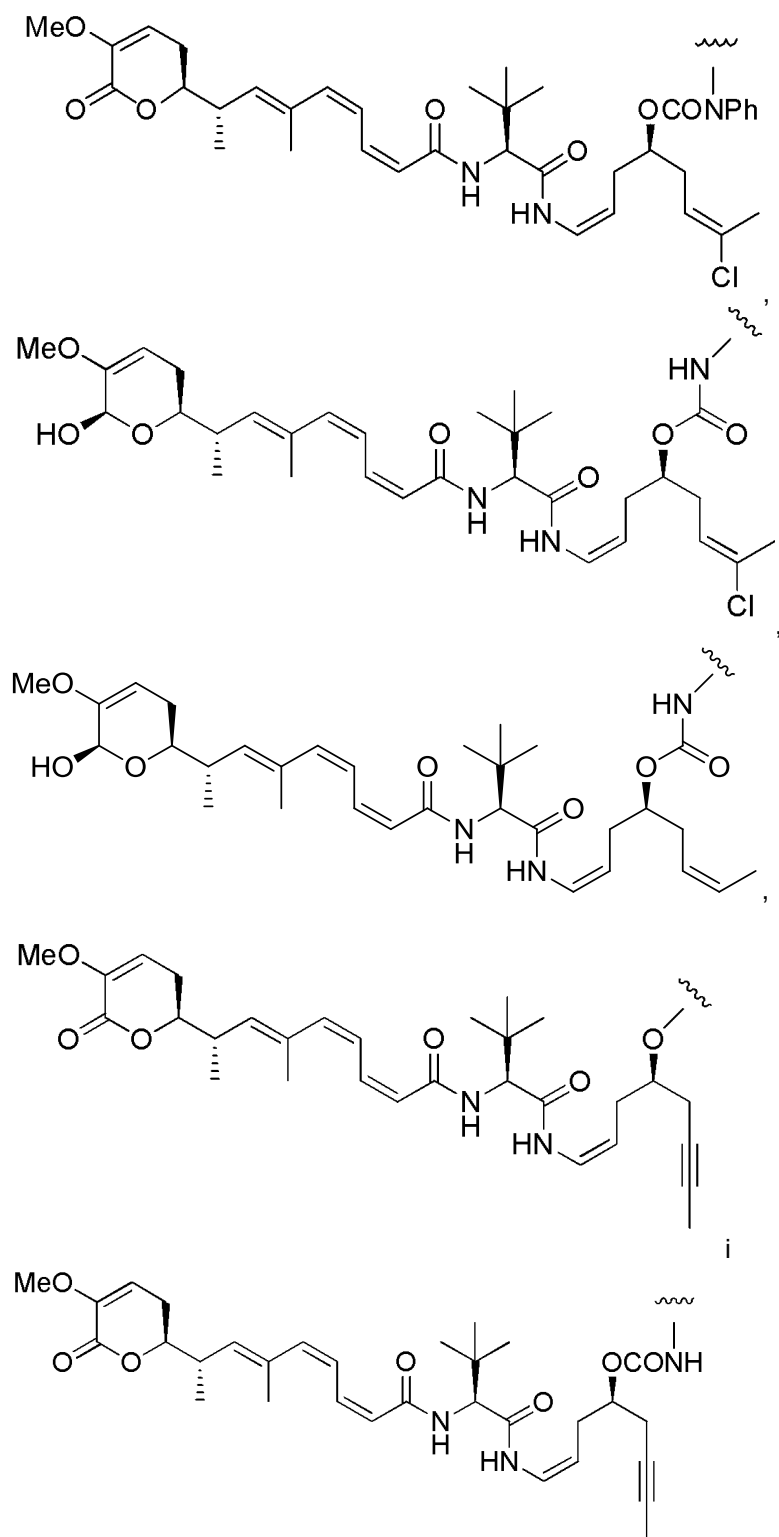






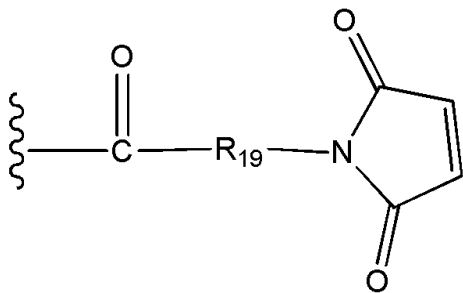






5

28. Сполука формули D-X-(AA)_w-L₁ або формули D-X-(AA)_w-H за пунктом 23, де:
L₁ являє собою групу формули:

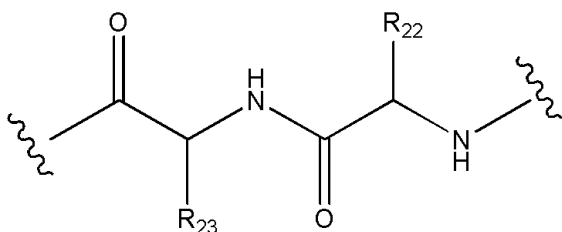


де:

хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до $(AA)_w$, якщо це має місце, або до X;

R_{19} являє собою $-C_5$ -алкілен-;

5 w має значення 0 або 2, і, коли w має значення 2, тоді $(AA)_w$ являє собою групу формули (III):

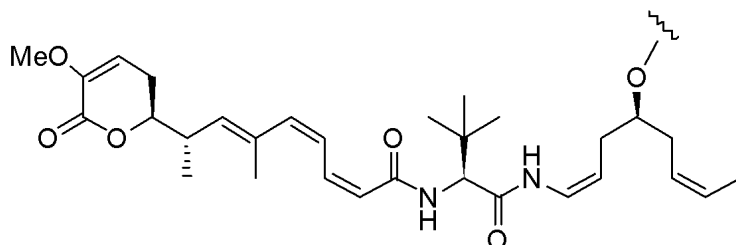
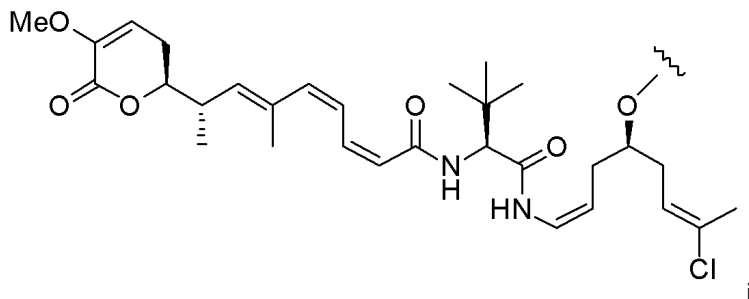


(III)

де R_{22} являє собою ізопропіл, R_{23} являє собою $-(CH_2)_3NHCONH_2$, де хвилясті лінії вказують місце ковалентних приєднань до X (хвиляста лінія ліворуч) і до L_1 або до атома водню (хвиляста лінія праворуч);

10 X являє собою розширювальну групу, вибрану з $-CONH(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -фенілен-NH-, $-CONH(CH_2)_3NH-$, $-CONH(CH_2)_3-S-$ і $-CONH(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S-$; і

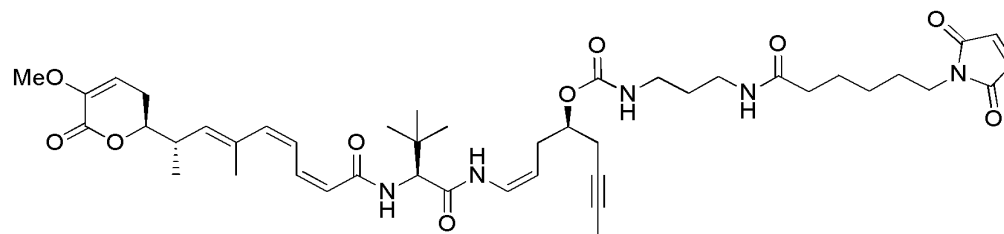
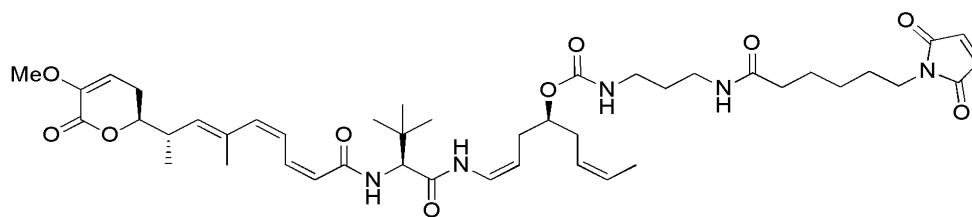
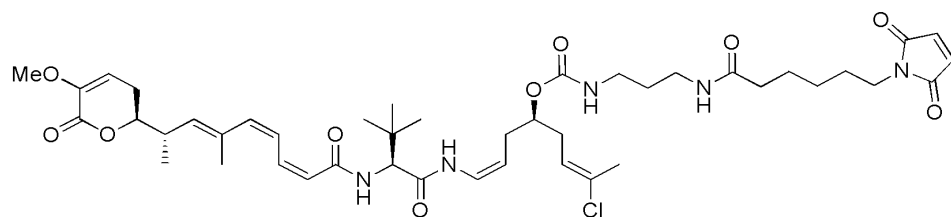
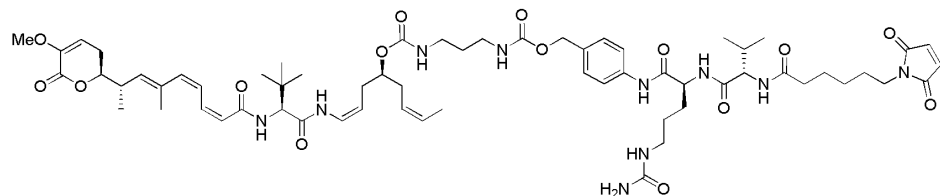
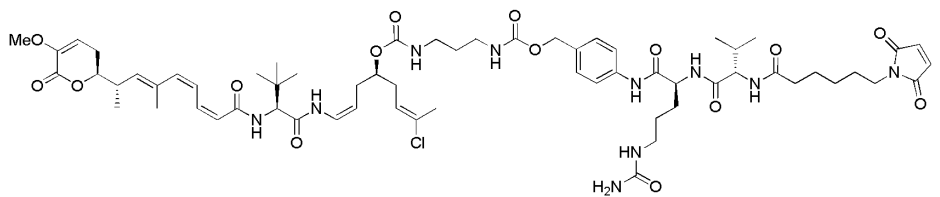
D означає групу, що являє собою лікарський засіб формули (Ia) або його фармацевтично прийнятну сіль, складний ефір, сольват, таутомер або стереоізомер, вибрану з:



15

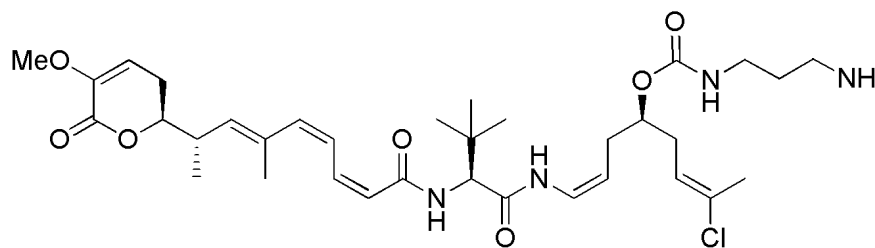
де хвиляста лінія вказує точку ковалентного приєднання до X.

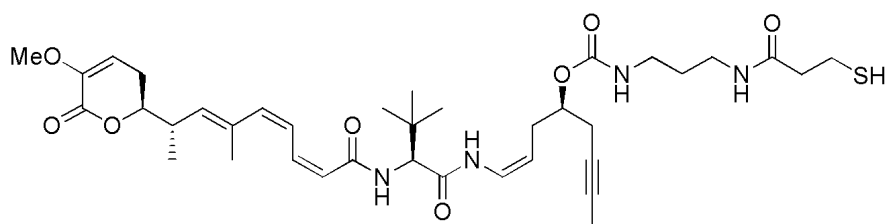
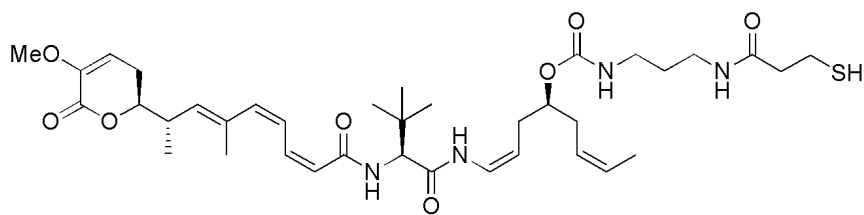
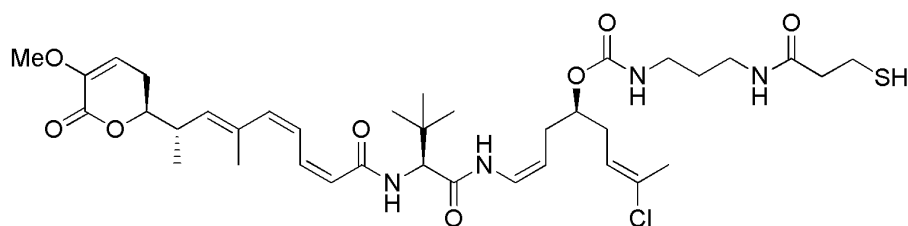
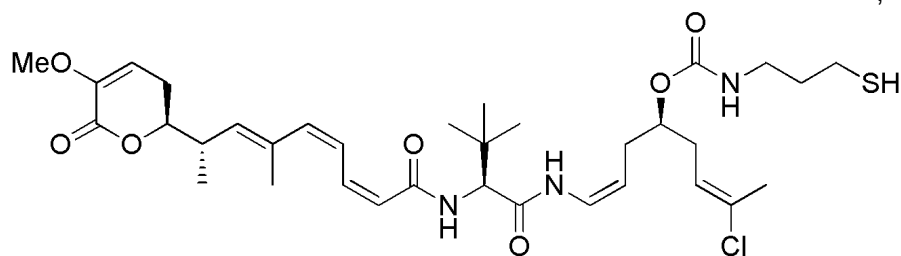
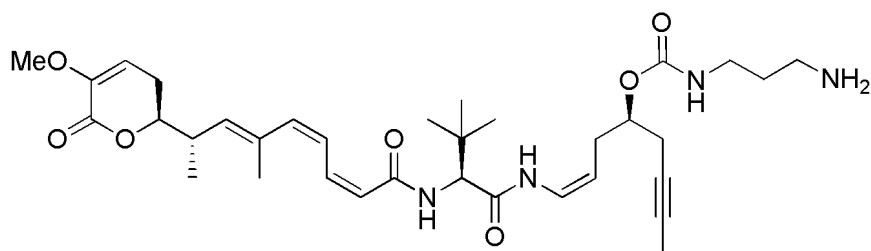
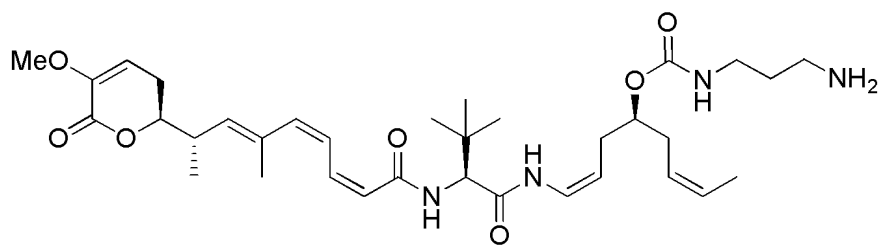
29. Сполука формули D-X- $(AA)_w-L_1$ за будь-яким одним з пунктів 23-28, вибрана з:



5

30. Сполука формули D-X-(AA)_w-H за будь-яким одним з пунктів 23-28, вибрана з:



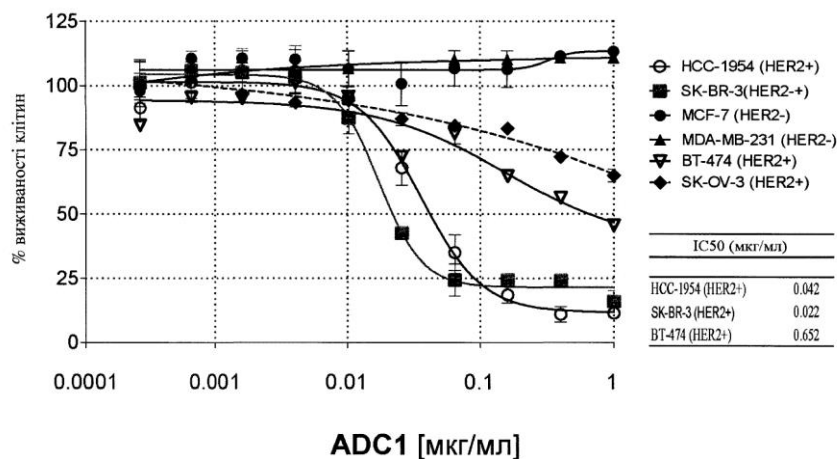
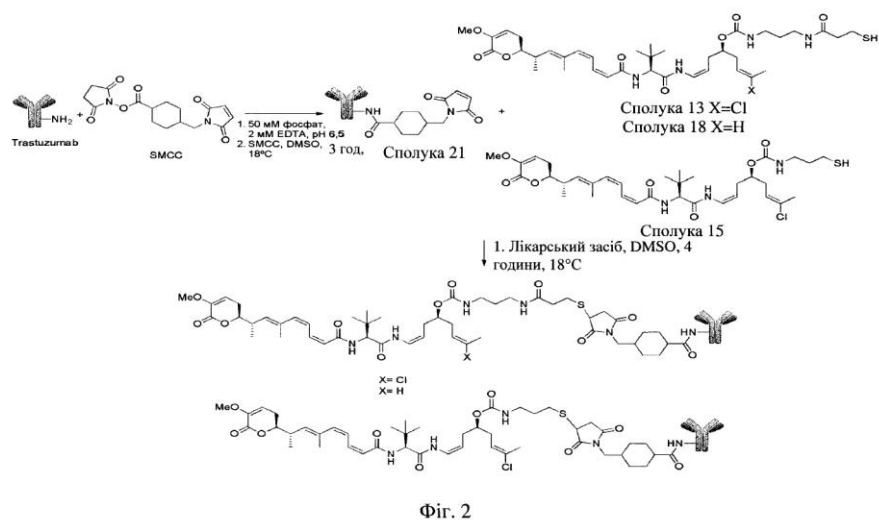
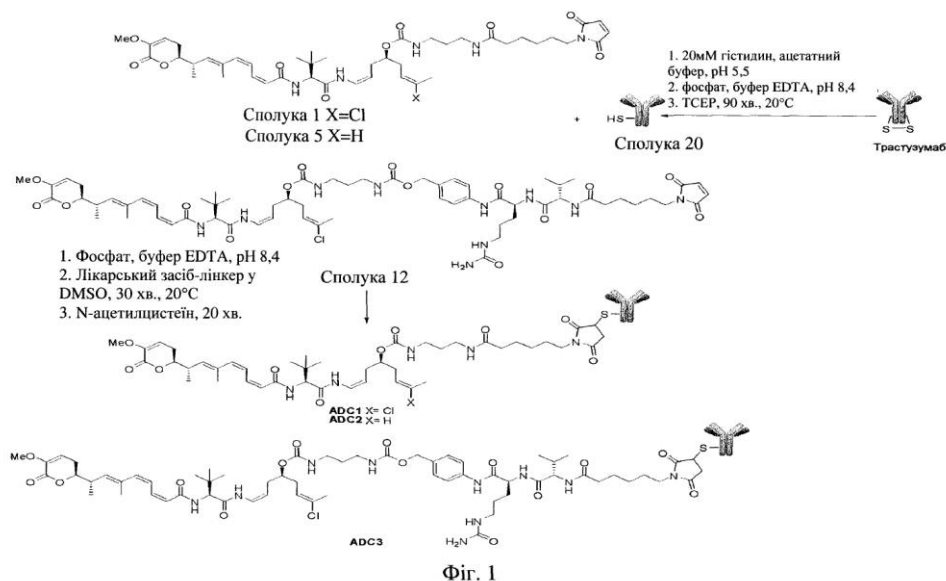


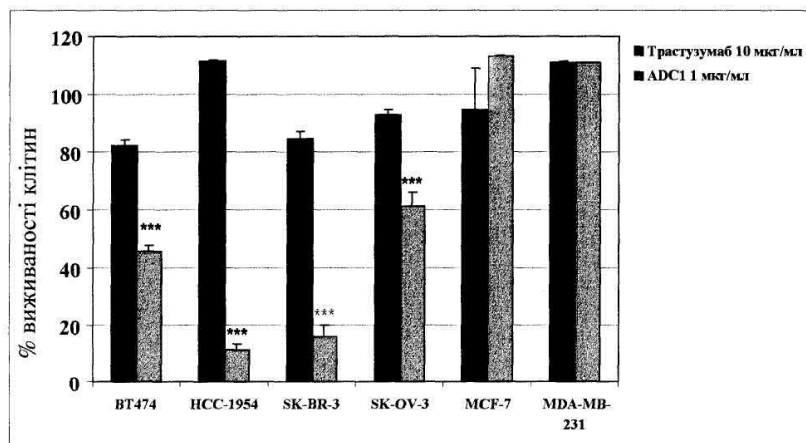
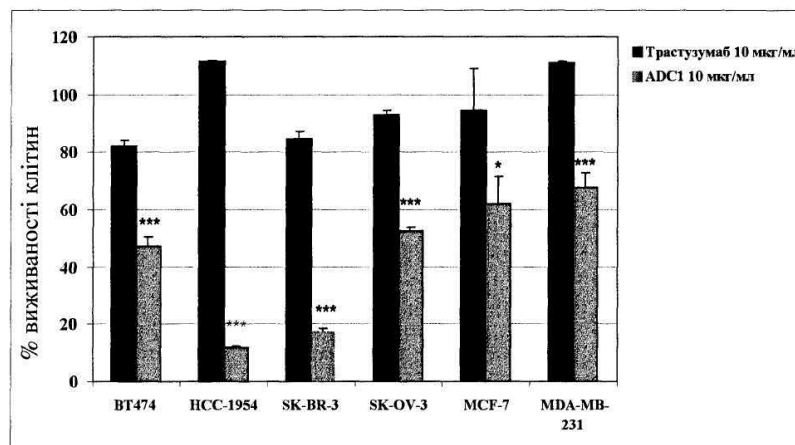
31. Кон'югат лікарського засобу за будь-яким одним з пунктів 1-22 для застосування як лікарського засобу.

32. Кон'югат лікарського засобу за будь-яким одним з пунктів 1-22 для застосування в лікуванні раку, більш переважно раку, вибраного з раку легень, колоректального раку, раку молочної

залози, раку підшлункової залози, раку нирки, лейкозу, множинної мієломи, лімфоми і раку яєчників.

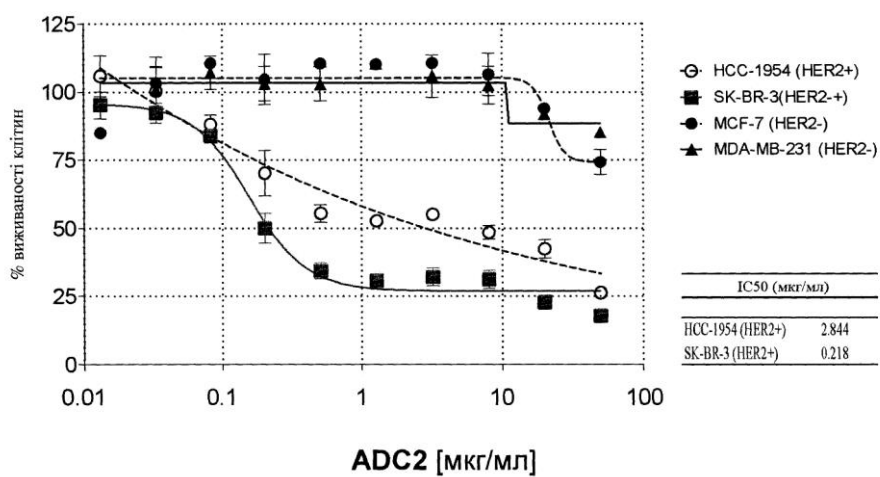
33. Фармацевтична композиція, яка включає кон'югат лікарського засобу за будь-яким одним з пунктів 1-22 і фармацевтично прийнятний носій.



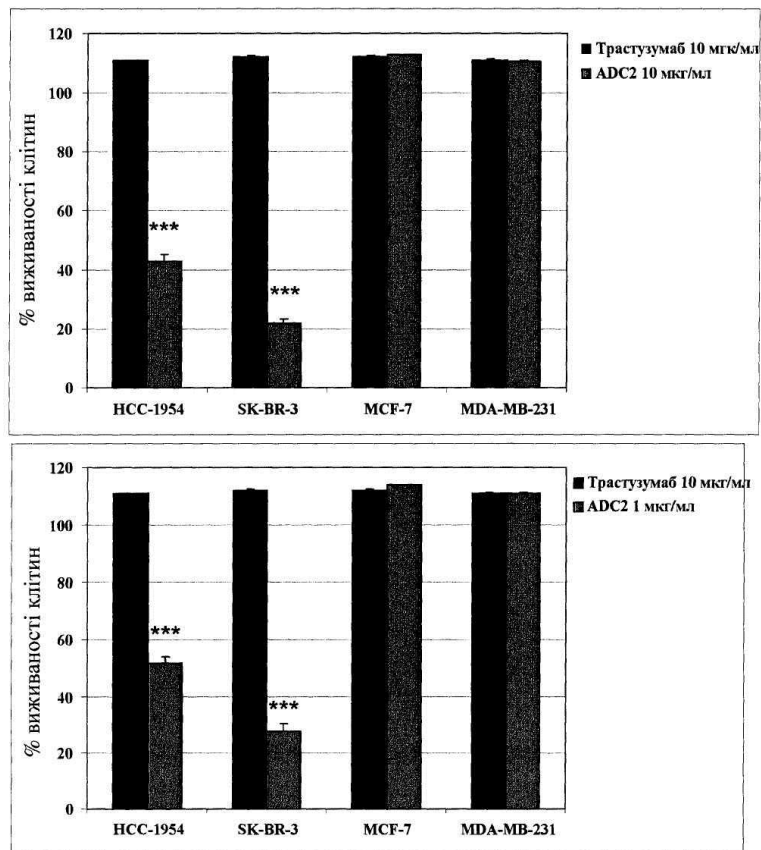


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 4

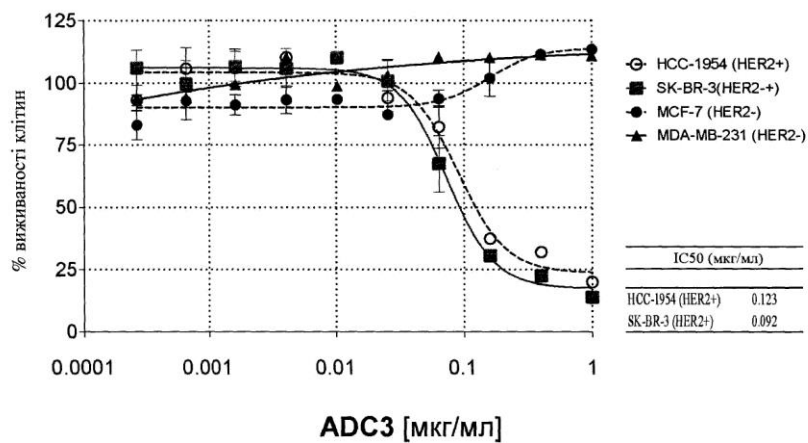


Фіг. 5

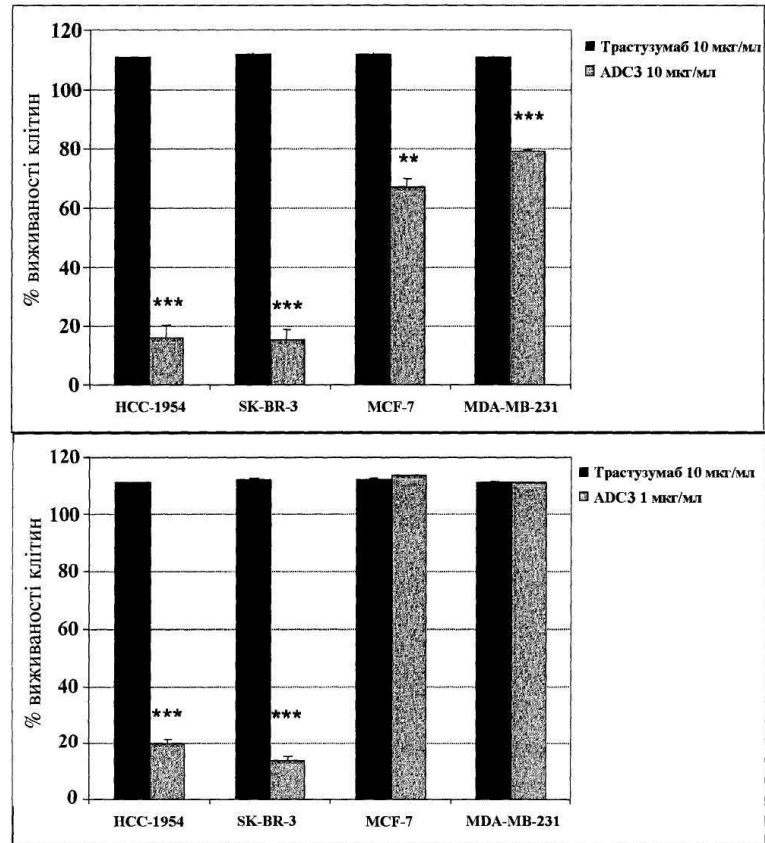


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 6

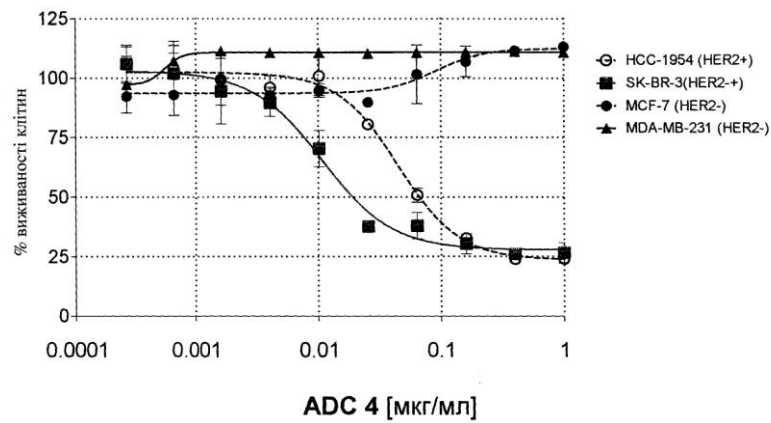


Фіг. 7

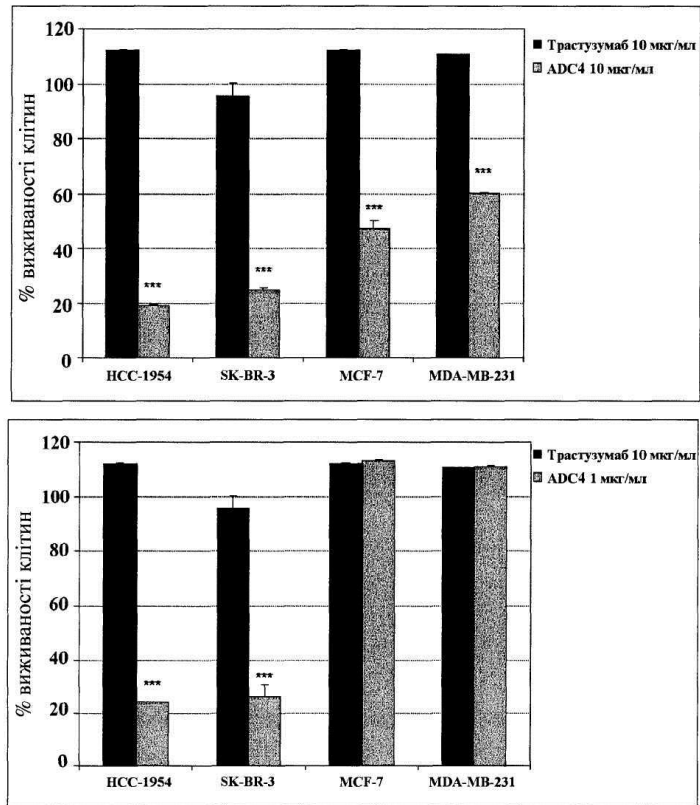


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Фіг. 8

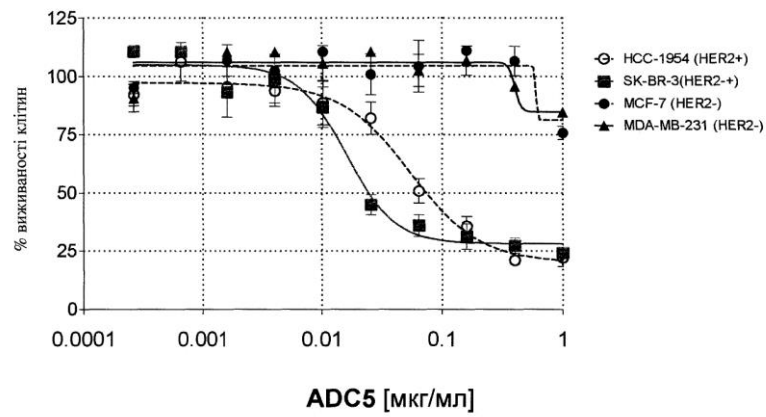


Фіг. 9

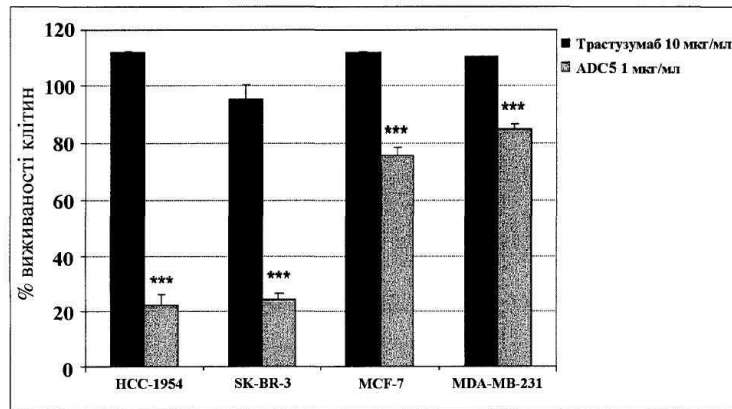
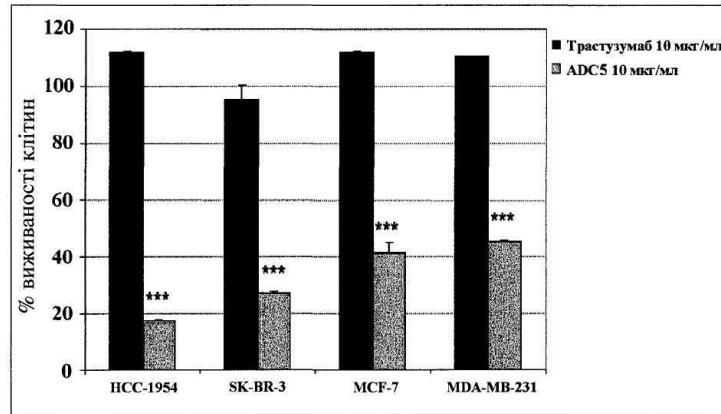


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): *** $p < 0,001$

Фіг. 10

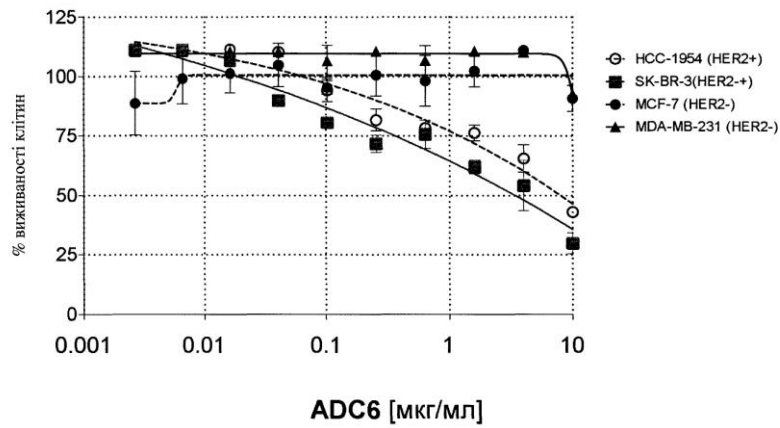


Фіг. 11

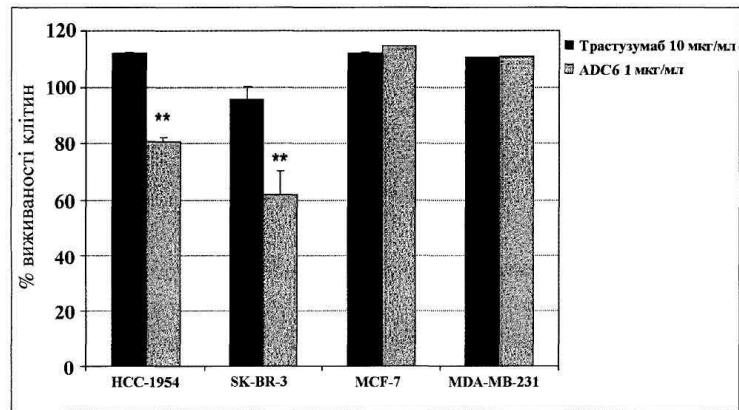
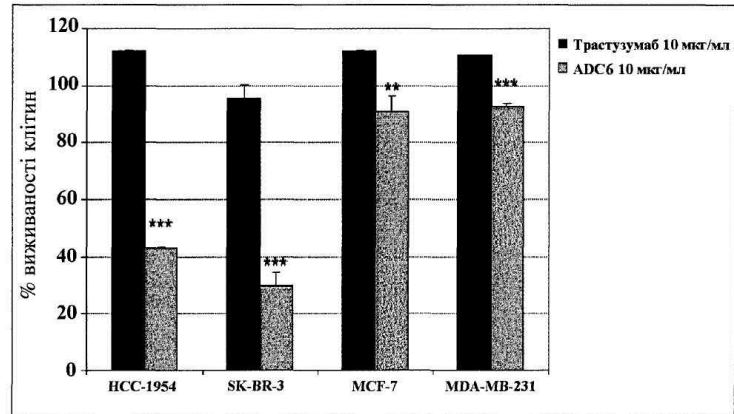


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): *** $p < 0,001$

Фіг. 12

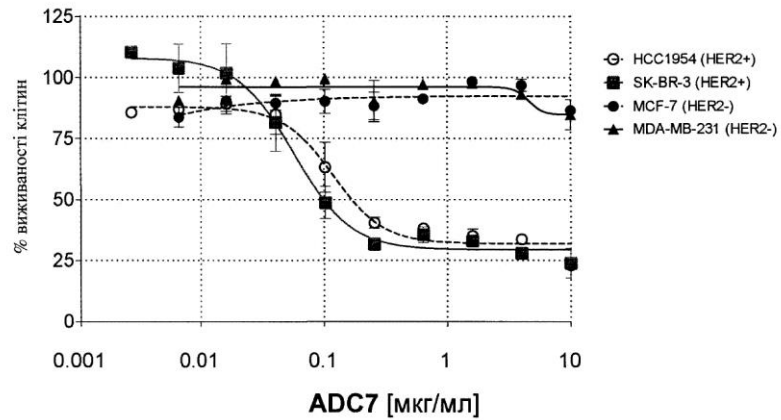


Фіг. 13

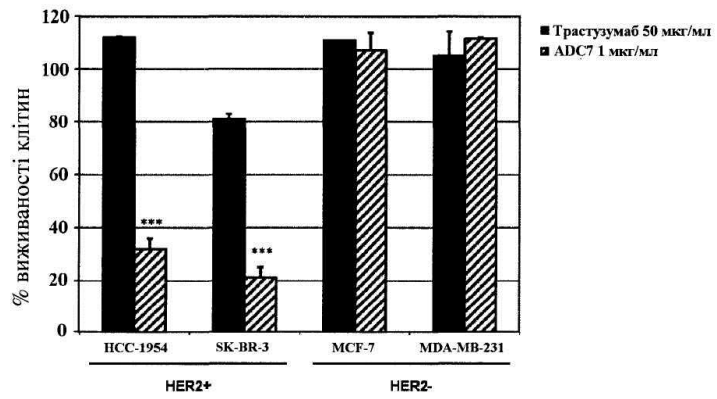
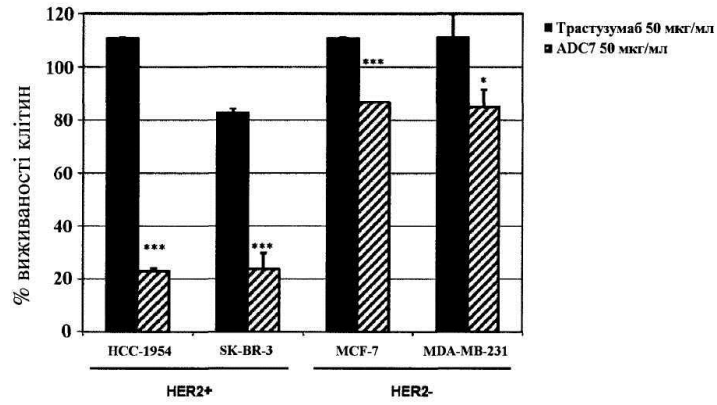


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,

Фіг. 14

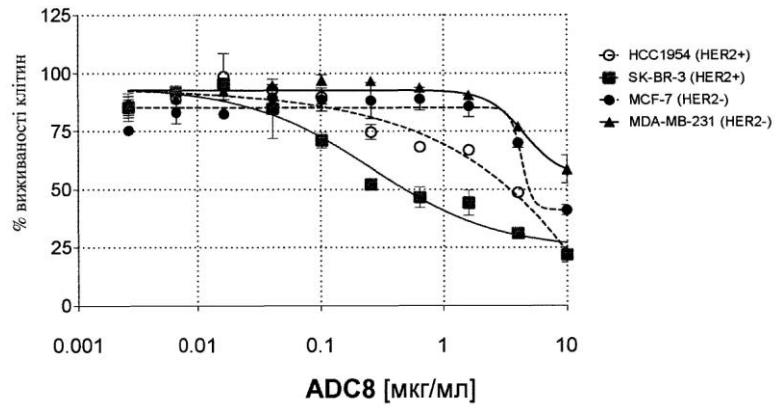


Фіг. 15

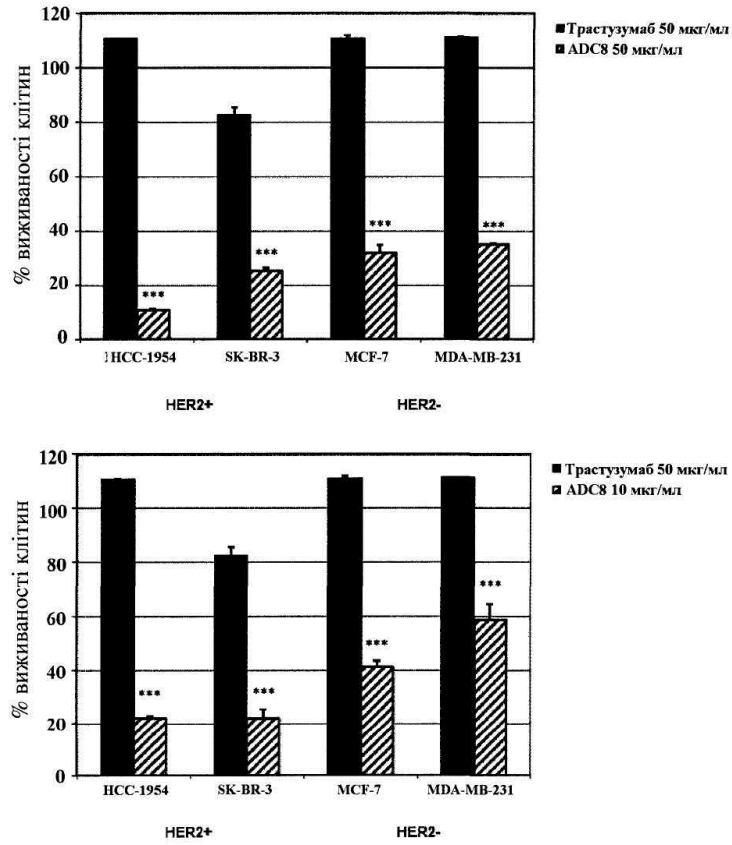


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,

Фіг. 16

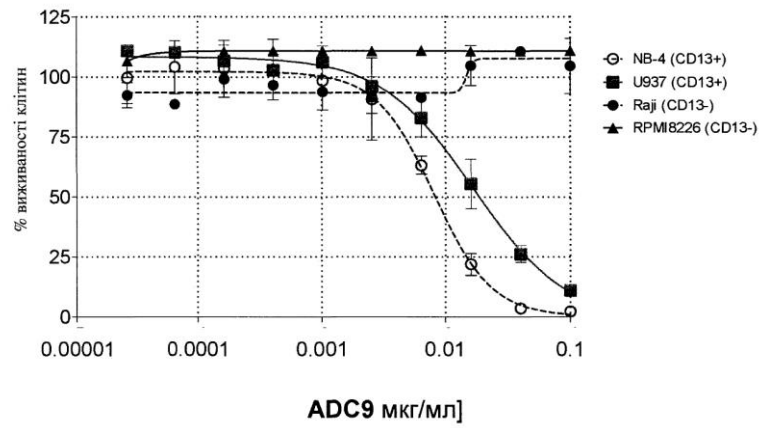


Фіг. 17

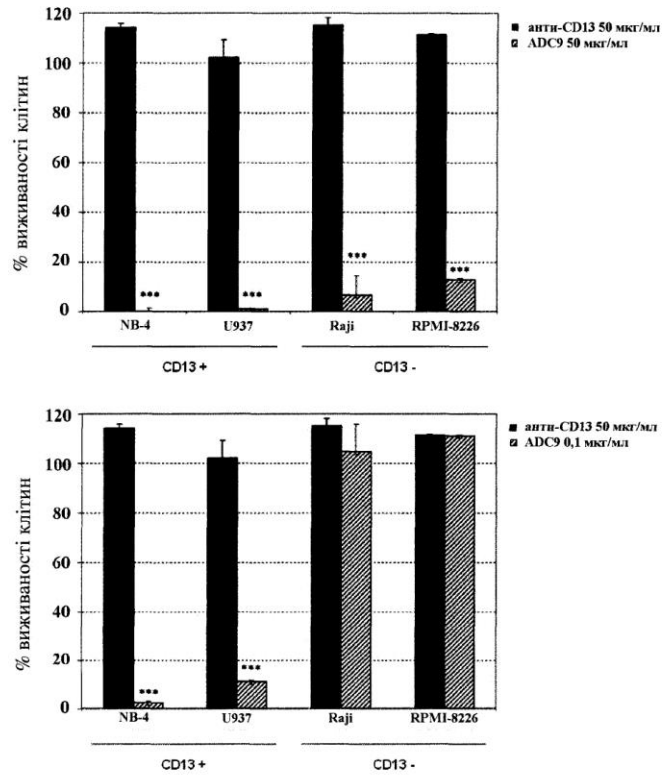


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): ***p<0,001

Фіг. 18

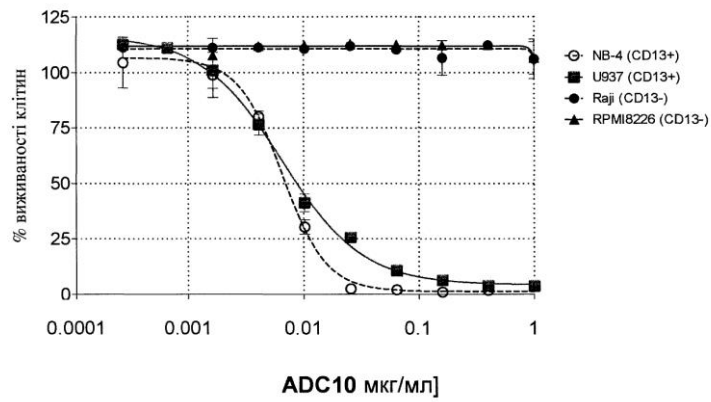


Фіг. 19

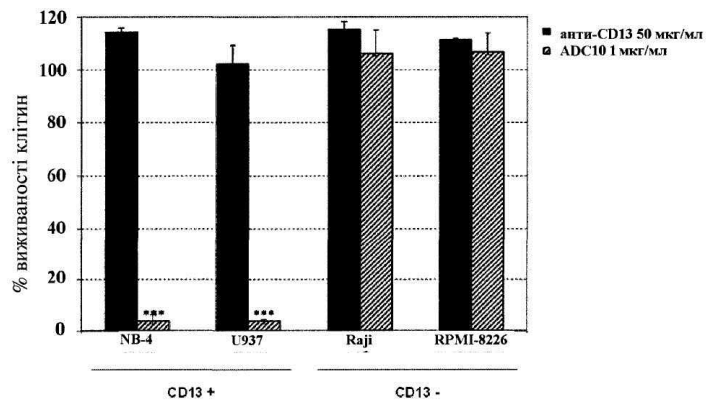
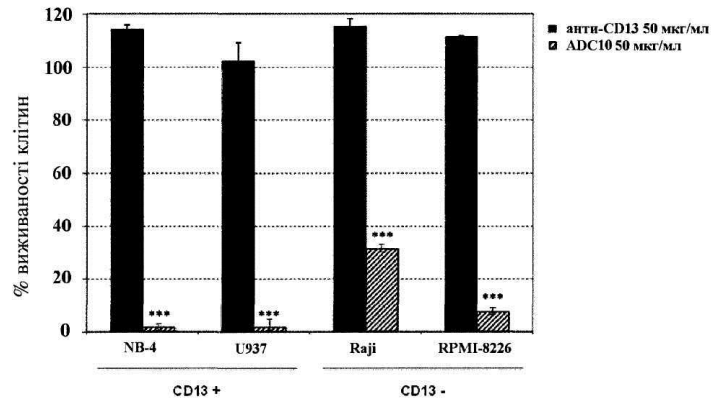


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): ***p<0,001

Фіг. 20

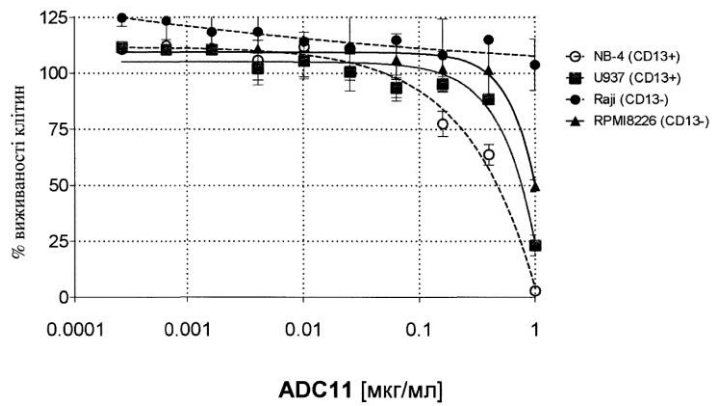


Фіг. 21

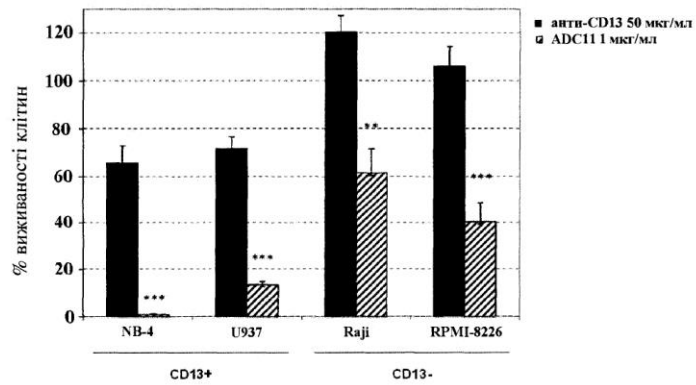
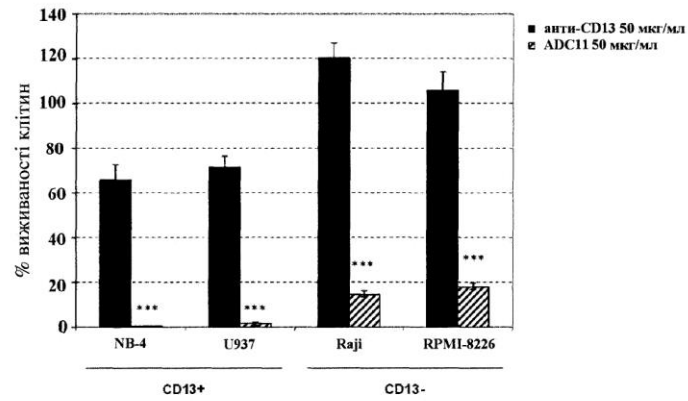


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): ***p<0,001

Фіг. 22

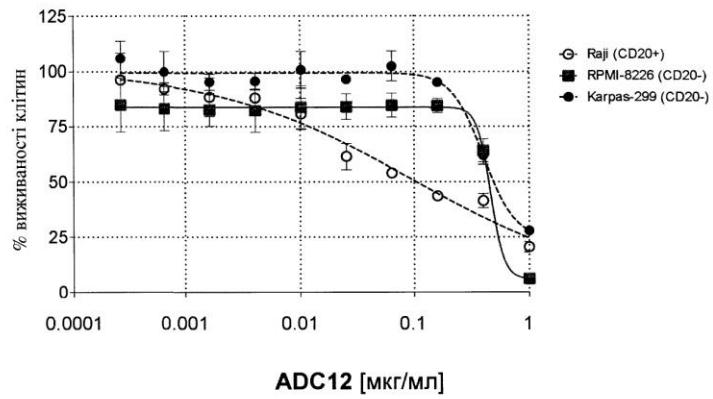


Фіг. 23

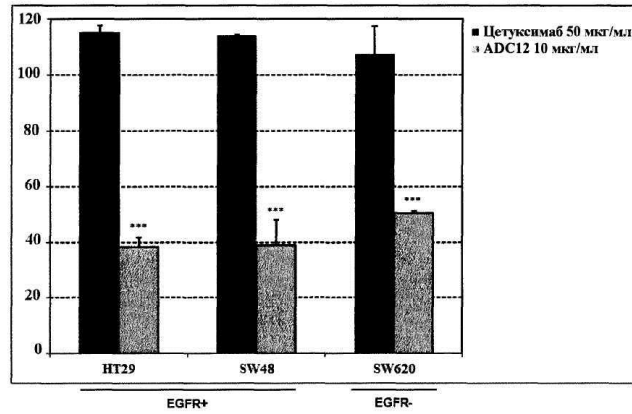


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 24

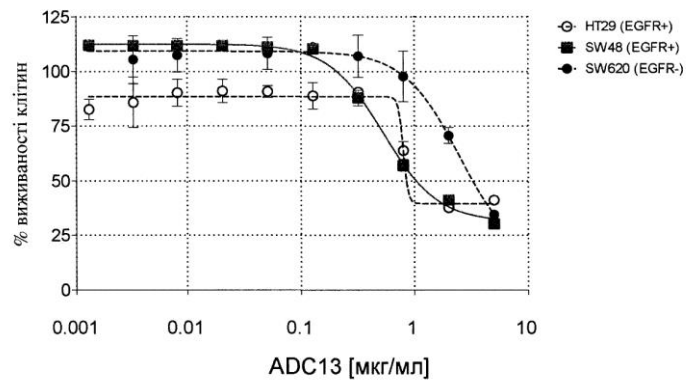


Фіг. 25

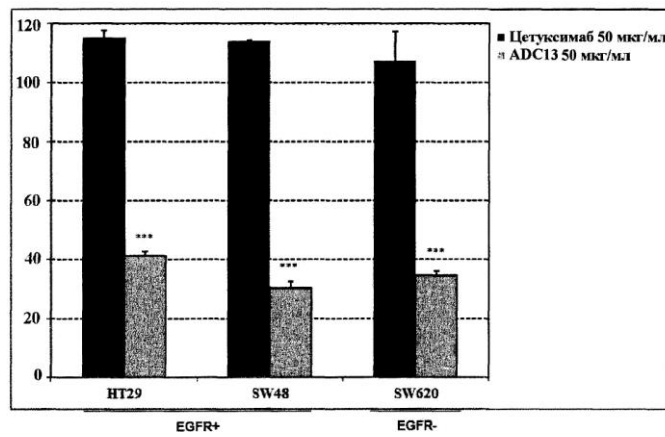


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): *** $p < 0,001$

Фіг. 26

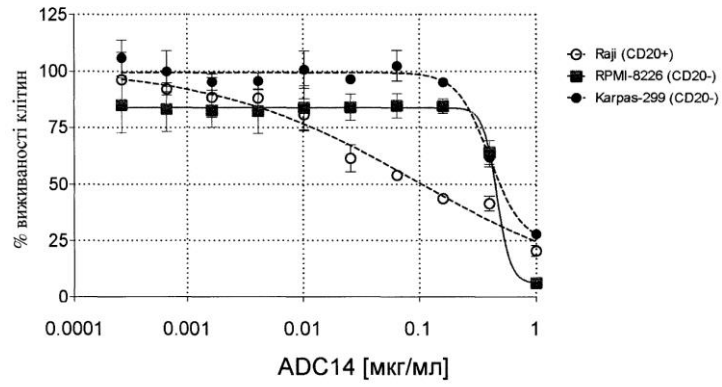


Фіг. 27

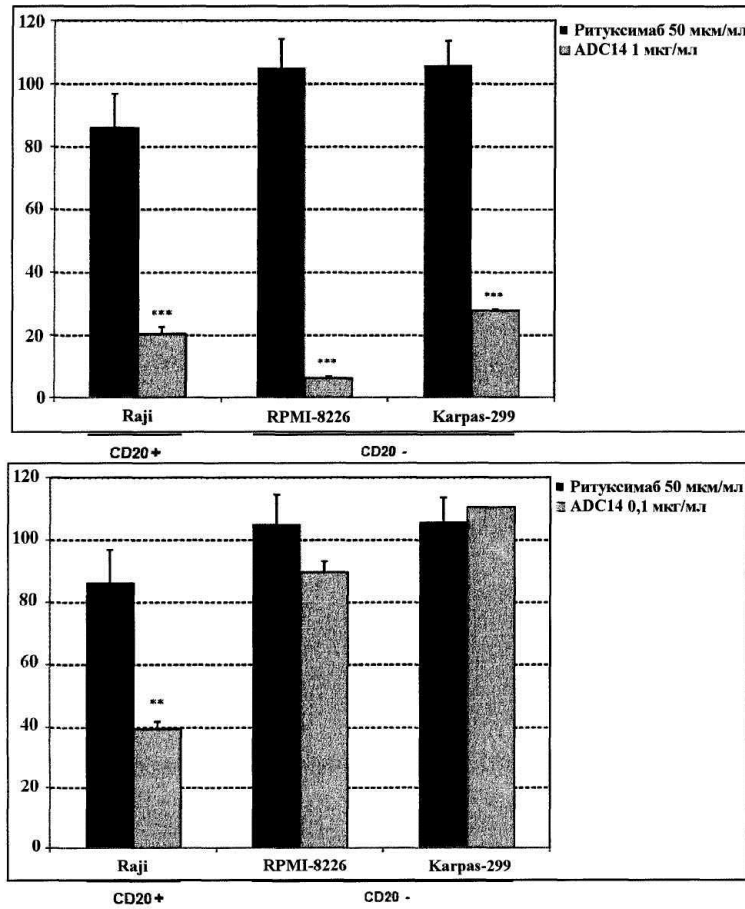


Статистична значимість (t-критерій Стюдента): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 28

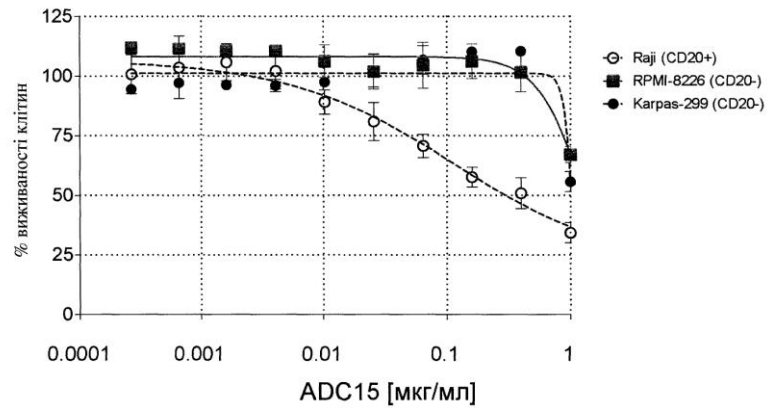


Фіг. 29

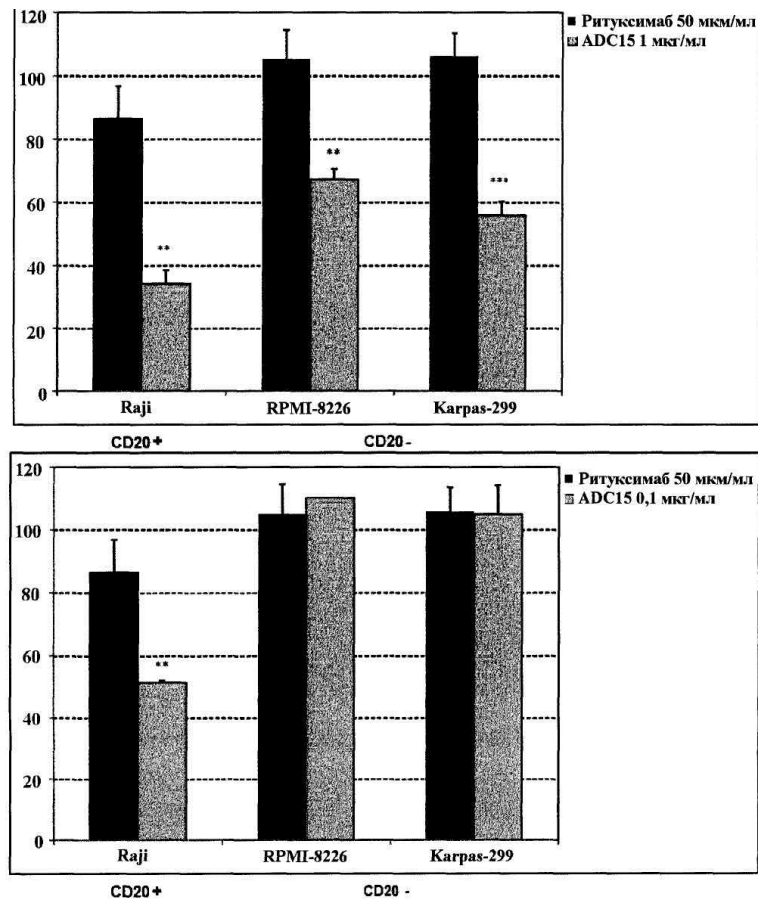


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,

Фіг. 30

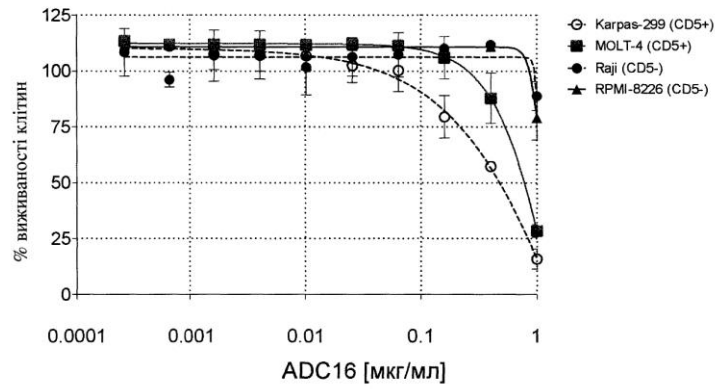


Фіг. 31

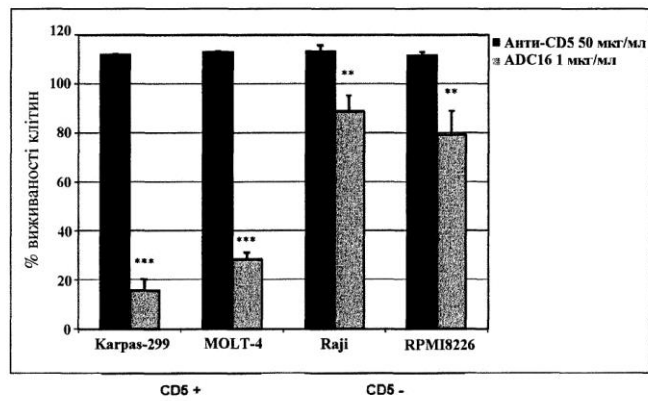


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 32

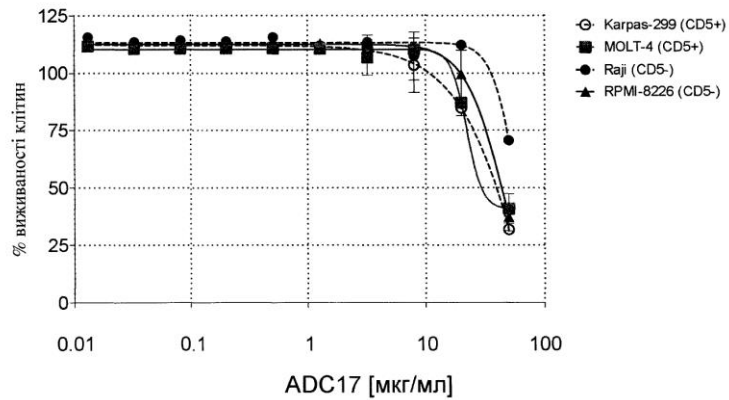


Фіг. 33

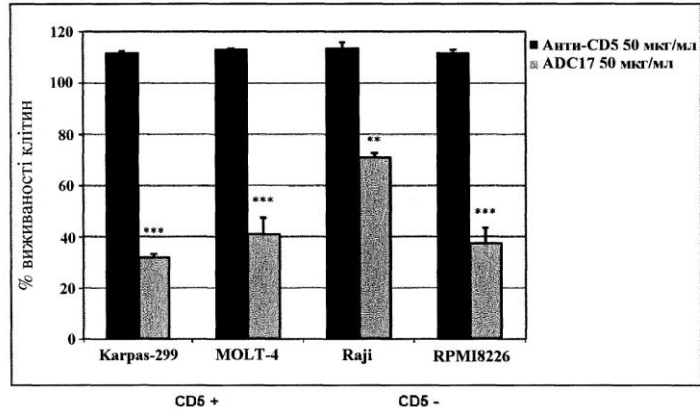


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 34

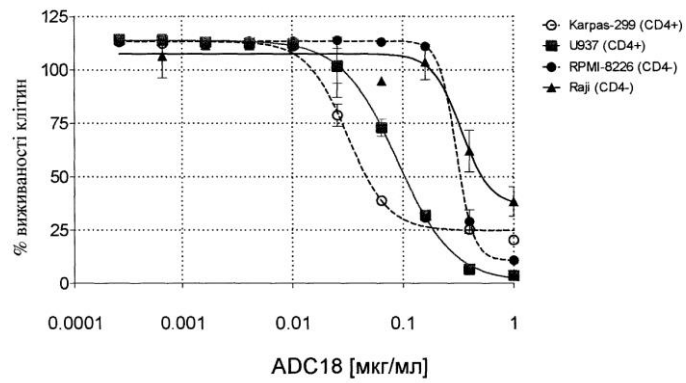


Фіг. 35

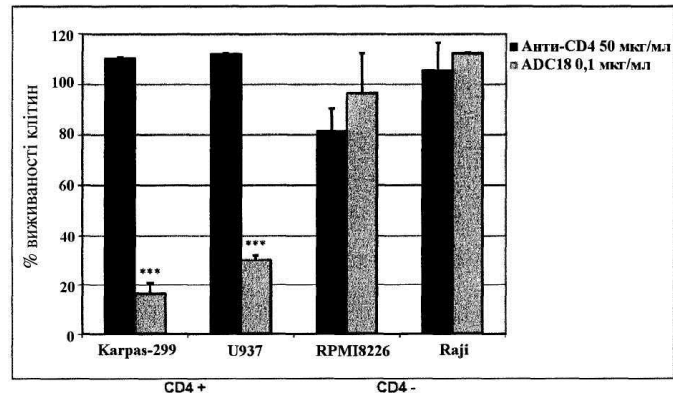
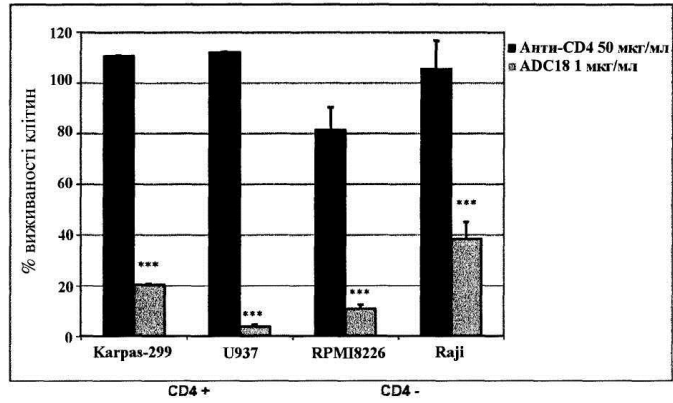


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 36

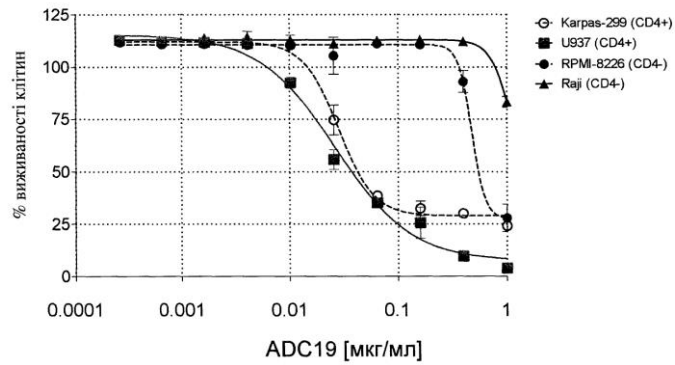


Фіг. 37

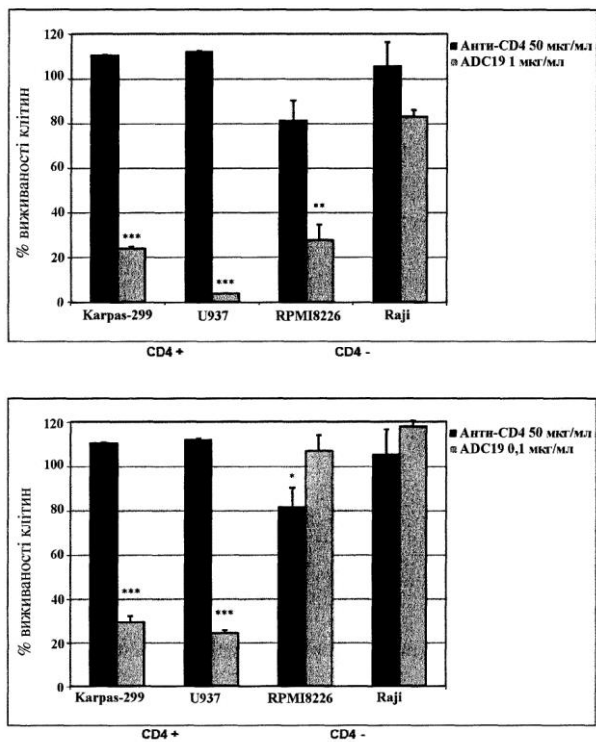


Статистична значимість (t-критерій Стьюдента): *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Фіг. 38



Фіг. 39



Статистична значимість (t-критерій Стюдента): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Фіг. 40

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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