

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046498**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.21

(51) Int. Cl. *A61K 31/351* (2006.01)

(21) Номер заявки
201690780

(22) Дата подачи заявки
2014.10.14

(54) **ПЕГИЛИРОВАННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА-ЛИНКЕРЫ ДЛЯ
УЛУЧШЕННОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ КОНЬЮГАТОВ ЛИГАНД-ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО**

(31) **61/891,320; 61/941,904; 61/947,742;
61/975,318**

(56) US-A1-20120107332
US-A1-2010/0062008
US-A1-20100260786

(32) **2013.10.15; 2014.02.19; 2014.03.04;
2014.04.04**

SENTER et al.: "Expanded Utility of the β -
Glucuronide Linker: ADCs That Deliver Phenolic
Cytotoxic Agents," ACS Med. Chem. Lett. 14 June
2010 (14.06.2010), Vol. 1, Pgs. 277-280, entire
document

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/060477**

(87) **WO 2015/057699 2015.04.23**

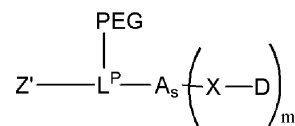
US-A1-20130309256

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лайон Роберт, Берк Патрик, Хантер
Джошуа (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение обеспечивает конъюгаты лиганд-лекарственное средство, включающие ПЭГ группу в параллельной ориентации по отношению к группе лекарственного средства. В частности, изобретение относится к соединению лекарственное средство-линкер или фармацевтически приемлемой соли такого соединения, где указанное соединение представлено структурой формулы IV, где значения Z' , L^P , A_s , X , D и m представлены в формуле изобретения



(IV).

B1**046498****046498****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая обычная заявка испрашивает приоритет согласно 35 USC § 119(e) на основании заявок США с порядковыми №№ 61/891320, поданной 15 октября 2013 г., 61/941904, поданной 19 февраля 2014 г., 61/947742, поданной 4 марта 2014 г., и 61/975318, поданной 4 апреля 2014 г., которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте.

Перечень последовательностей

Перечень последовательностей, обозначенный как 2700-00114PC-ST25.txt 13 KB, созданный 9 октября 2014 г., включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Огромный интерес вызывает использование моноклональных антител (mAbs) для направленной доставки цитотоксических средств к раковым клеткам. При создании конъюгатов антитела с лекарственным средством путем присоединения цитотоксического средства к антителу, типично через линкер, необходимо учитывать различные факторы. Эти факторы включают природу и расположение химической группы для конъюгации цитотоксического средства, механизм высвобождения средства, структурный элемент(элементы) (если таковые имеются), обеспечивающие высвобождение цитотоксического средства, и структурную модификацию высвобожденного свободного средства, если это имеет место. Кроме того, если цитотоксическое средство должно высвобождаться после интернализации антитела, структурные элементы и механизм высвобождения средства должны соответствовать внутриклеточному транспорту конъюгата.

Хотя был оценен ряд различных классов лекарственных средств для доставки через антитела, только несколько классов лекарственных средств оказались достаточно активными в качестве конъюгатов антител с лекарственными средствами, имея при этом подходящий профиль токсичности, что является основанием для клинических исследований. Один такой класс представляет собой ауристатины, родственные природному продукту доластатину 10. Репрезентативные ауристатины включают ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолейцин-долапролин-норэфедрин) и ММАF (N-метилвалин-валин-долаизолейцин-долапролин-фенилаланин).

ММАЕ представляет собой пример цитотоксического средства, которое является активным в качестве свободного лекарственного средства, и является высокоактивным, когда оно конъюгировано с моноклональным антителом (mAb) и высвобождается после интернализации в клетках. ММАЕ успешно конъюгировали с mAb по N-концевой аминокислоте ММАЕ через катепсин В-расщепляемый пептидный линкер, содержащий малеимидокапроил-валин-цитруллин (mc-vc-) и саморасщепляющуюся группу п-аминобензил-карбамоил (РАВС), с получением конъюгатов антитела с лекарственным средством следующей структуры mAb-(mc-vc-РАВС-ММАЕ)_p. (В представленной формуле, p относится к количеству (mc-vc-РАВС-ММАЕ) звеньев на антитело.) При расщеплении связи между vc пептидом и саморасщепляющейся РАВС группой, РАВС группа высвобождается из ММАЕ, выделяя свободный ММАЕ.

Другой ауристин, ММАF, является относительно менее активным в качестве свободного лекарственного средства (по сравнению с ММАЕ), но при этом является высокоактивным, когда он конъюгирован с антителом и интернализирован в клетках. ММАF успешно конъюгировали с моноклональным антителом (mAb) по N-концевой аминокислоте ММАF через катепсин В-расщепляемый пептидный линкер, содержащий малеимидокапроил-валин-цитруллин (mc-vc-) и саморасщепляющуюся группу п-аминобензил-карбамоил (РАВС), с получением конъюгатов антитело-лекарственное средство, имеющих структуру mAb-(mc-vc-РАВС-ММАF)_p, где p относится к количеству (mc-vc-РАВС-ММАF) звеньев на антитело. При расщеплении пептидного линкера саморасщепляющаяся РАВС группа высвобождается из ММАF, выделяя свободный ММАF.

Также было обнаружено, что ММАF является активным в виде нерасщепляемого конъюгата, содержащего лекарственное средство-линкер, включающий малеимидокапроил ММАF (mcММАF). Когда этот конъюгат, mAb-(mcММАF)_p, интернализуется в клетках, высвобождаемое активное вещество представляет собой cys-mcММАF.

Поскольку линкер является нерасщепляемым, малеимидокапроил и цистеиновый остаток антитела остаются присоединенными к N-концу ММАF. Также сообщалось о том, что ММАF является активным в виде С-концевого конъюгата, связанного по С-концевой аминокислоте, фенилаланину, с пептид-малеимидокапроильным линкером. Когда этот конъюгат, (ММАF-пептид-mc) p-mAb интернализуется в клетках, активное вещество, ММАF, высвобождается после расщепления ММАF(фенилаланин)-пептидной связи.

В животных моделях эти ММАЕ и ММАF конъюгаты продемонстрировали зависимое от нагрузки лекарственным веществом снижение фармакокинетических свойств. В частности, при увеличении количества лекарственного средство-линкер групп, присоединенных к каждому антителу, фармакокинетические свойства конъюгатов снижались.

Поэтому еще одним важным фактором в конструкции конъюгатов является количество лекарственного вещества, которое может доставляться в расчете на агент направленной доставки (т.е. количество цитотоксических средств, присоединенных к каждому агенту направленной доставки (например, антителу), указываемое как нагрузка лекарственным веществом или содержание лекарственного вещества).

Исторически исходили из того, что более высокие нагрузки лекарственным веществом лучше, чем более низкие нагрузки лекарственным веществом (например, 8 нагрузок по сравнению с 4 нагрузками). Это объясняли тем, что имеющие более высокие нагрузки конъюгаты будут доставлять больше лекарственного вещества (цитотоксических средств) к клеткам-мишеням. Это обоснование подкреплялось наблюдениями, что конъюгаты с более высокими нагрузками лекарственным веществом были более активными против клеточных линий *in vitro*. Некоторые более поздние исследования, однако, показали, что это предположение не подтверждалось в животных моделях. Наблюдали, что конъюгаты, имеющие нагрузки лекарственными веществами, некоторыми ауристинатами, 4 или 8, имели одинаковые активности в мышиных моделях. Hamblett et al., *Clinical Cancer Res.* 10:7063-70 (2004). Hamblett et al. также сообщали, что перегруженные ADCs более быстро выводились из системы кровообращения в животных моделях. Этот более быстрый клиренс говорит о большем влиянии на фармакокинетические свойства в средствах с более высокой нагрузкой по сравнению со средствами, имеющими более низкую нагрузку. Hamblett et al. Кроме того, конъюгаты с более высокой нагрузкой имели более низкие MTDs у мышей и, как результат, имели более узкие терапевтические диапазоны, которые были указаны. Id. В отличие от этого, сообщалось, что ADCs с нагрузкой лекарственным веществом равной 2 на сконструированных сайтах в моноклональном антителе имеют такие же или лучшие фармакокинетические свойства и терапевтические индексы по сравнению с некоторыми ADC с нагрузкой 4. Например, см. Junutula et al., *Clinical Cancer Res.* 16:4769 (2010). Таким образом, последние тенденции связаны с разработкой ADCs с низкими нагрузками лекарственными веществами.

Поэтому существует потребность в форматах конъюгатов антител с лекарственными средствами (и, в более широком смысле, форматах для других конъюгатов), которые обеспечивают возможность более высокой нагрузки лекарственным веществом, но будут сохранять другие характеристики конъюгатов с более низкой нагрузкой, такие как подходящие фармакокинетические свойства. К удивлению, настоящее изобретение отвечает этим потребностям.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата L540cy (Лимфома Ходжкина) при введении более высокой одноразовой дозы (2 мг/кг) с использованием композиций непегелированного ADC, cAC10-[mc-PAB(gluc)MMAE]_p, (cAC10-1), параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-10) и последовательно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-4) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab.

Фиг. 2. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата Karpas299 (ALCL) при введении более высокой одноразовой дозы (0,6 мг/кг) с использованием композиций непегелированного ADC (cAC10-1), параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-10) и последовательно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-4) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab.

Фиг. 3. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата L540cy (Лимфома Ходжкина) при введении более низкой одноразовой дозы (0,5 мг/кг) с использованием композиций непегелированного ADC (cAC10-1), параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-10) и последовательно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-4).

Фиг. 4. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата Karpas299 (ALCL) при введении более низкой одноразовой дозы (0,15 мг/кг) с использованием композиций непегелированного ADC (cAC10-1), параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-10) и последовательно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-4) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab.

Фиг. 5. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата Karpas299 (ALCL) при введении одноразовой дозы 0,2 мг/кг с использованием композиций непегелированного ADC, cAC10-[MDpr-PAB(gluc)-MMAE]_p (cAC10-14) и параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-16) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab (т.е. p=8).

Фиг. 6. Средний объем опухоли против дней после имплантации для модели ксенотрансплантата Ramos (Лимфома Беркитта) при введении одноразовой дозы 1 мг/кг с использованием композиций непегелированного ADC, hBU12-[MDpr-PAB(gluc)-MMAE]_p (hBU12-14) и параллельно-ориентированного пегелированного ADC (hBU12-16) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab (т.е. p=8).

Фиг. 7. Фармакокинетический профиль (общая концентрация Ab в мкг/мл против времени в днях) крысы после одноразовой внутривенной 3 мг/кг дозы композиций неконъюгированного cAC10 антитела, его непегелированного ADC (cAC10-1), параллельно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-10) и последовательно-ориентированного пегелированного ADC (cAC10-4) со средней нагрузкой лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества/Ab.

Фиг. 8. Хроматограммы, полученные методом эксклюзионной хроматографии, для cAC10 ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab, содержащих непегелированные лекарственные средст-

ва-линкеры и параллельно-ориентированные пегелированные группы лекарственное средство-линкер, где группа лекарственное средство-линкер представляет собой MDpr-VC-PAVA-MMAE, с ПЭГ Группами разной длины: сАС10-А (непегелированный), сАС10-В (ПЭГ₁₂), сАС10-С (ПЭГ₂₄), сАС10-Д (ПЭГ₃₆), сАС10-Е (ПЭГ₁₂ + ПЭГ₃₆), сАС10-Ф (ПЭГ₂₄ + ПЭГ₃₆) и сАС10-Г (ПЭГ₃₆ + ПЭГ₃₆).

Фиг. 9. Фармакокинетический профиль (общая концентрация Ab в мкг/мл против времени в днях) крысы после однократной внутривенной 3 мг/кг дозы сАС10 ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab, содержащих непегелированные лекарственные средства-линкеры, где ADC конъюгат представляет собой с-АС10-MDpr-VC-PAV-MMAE (сАС10-А) и сАС10-mc-VC-PAVA-MMAE (сАС10-К), и параллельно-ориентированные пегелированные группы лекарственное средство-линкер, где ADC представлен структурой сАС10-[MDpr(-X-D)-ПЭГ₂₄]_p, и -X-D представляет собой MDpr-VC-PAV-MMAE (сАС10-С) или mc-VC-PAVA-MMAE (сАС10-Л), и p=8, по сравнению с контрольными конъюгатами сАС10-НАЕМ (сАС10-И), имеющими ПЭГ₂₄ каркас, блокированный с использованием н-этиламинолеимида (т.е. без присоединенного лекарственного средства).

Фиг. 10. Фармакокинетический профиль (общая концентрация Ab в мкг/мл против времени в днях) крысы после однократной внутривенной 3 мг/кг дозы сАС10 ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab, содержащих непегелированные группы лекарственное средство-линкер, где ADC конъюгат представляет собой с-АС10-[MDpr-VC-PAV-MMAE]_p (сАС10-А), или параллельно-ориентированные пегелированные группы лекарственное средство-линкер, где ADC представлен структурой сАС10-[MDpr(-X-D)-ПЭГ]_p, где p=8, -X-D представляет собой MDpr-VC-PAV-MMAE, и ПЭГ представляет собой ПЭГ Группу разной длины: ПЭГ₁₂ (сАС10-В), ПЭГ₂₄ (сАС10-С) и ПЭГ₃₆ (сАС10-Д), по сравнению с соответствующими контрольными конъюгатами, имеющими ПЭГ каркас, блокированный с использованием н-этиламинолеимида (т.е. без присоединенного лекарственного средства): ПЭГ₁₂ (сАС10-Н), ПЭГ₂₄ (сАС10-И) и ПЭГ₃₆ (сАС10-Ж).

Фиг. 11. Объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата L540cy при введении один раз внутривенно 2 мг/кг непегелированного ADC: с-АС10-[MDpr-VC-PAV-MMAE]_p (сАС10-А), по сравнению с необработанным животным.

Фиг. 12. Объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата L540cy при введении один раз внутривенно 2 мг/кг параллельно-ориентированного пегелированного ADC (сАС10-В): сАС10-[MDpr(-X-D)-ПЭГ₁₂]_p, где p=8, и -X-D представляет собой MDpr-VC-PAV-MMAE, по сравнению с необработанным животным.

Фиг. 13. Объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата L540cy при введении один раз внутривенно 2 мг/кг параллельно-ориентированного пегелированного ADC (сАС10-С): сАС10-[MDpr(-X-D)-ПЭГ₂₄]_p, где p=8 и -X-D представляет собой MDpr-VC-PAV-MMAE, по сравнению с необработанным животным.

Фиг. 14. Средний объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата рака молочной железы с использованием непегелированного ADC, направленного на антиген LIV-1: hLIV22-[mc-VC-PAV-MMAE]_p или hLIV22-[MDpr(-X-D)-ПЭГ₂₄]_p, где p=8, и -X-D представляет собой mc-VC-PAV-MMAE, по сравнению с необработанными животными.

Фиг. 15: Средний объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата L540cy при введении один раз внутривенно 1 или 0,5 мг/кг непегелированного ADC: сАС10-[mc-PAV (gluc)-MMAE]_p (сАС10-1), или его соответствующего параллельно-ориентированного пегелированного ADC: сАС10-{mc-[PAV(gluc)-MMAE]-ПЭГ₂₄}_p (сАС10-10), где p=4, по сравнению с необработанными животными.

Фиг. 16. Средний объем опухоли (мм²) против дней после трансплантации опухоли в модели ксенотрансплантата Karpas299 при введении один раз внутривенно 0,3 или 0,15 мг/кг непегелированного ADC: сАС10-[mc-PAV(gluc)-MMAE]_p (сАС10-1), или его соответствующего параллельно-ориентированного пегелированного ADC: сАС10-{mc-[PAV(gluc)-MMAE]-ПЭГ₂₄}_p (сАС10-10), где p=4, по сравнению с необработанными животными.

Фиг. 17. Кривые доза-ответ для hBU12 ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества, содержащих пегелированные каркасы разной длины для их ПЭГ Групп, против панели клеточных линий неходжкинской лимфомы, где группа лекарственное средство-линкер представлена структурой MDpr-L^p-(ПЭГ)_x(PAV(glu)), где L^p представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x=0 (hBU12-14), где ПЭГ Группу по эpsilon-аминолизина замещают ацетилом, x имеет значение 2 (hBU12-43), 4 (hBU12-42), 8 (hBU12-18), 12 (hBU12-17), 24 (hBU12-16), или представляет собой разветвленную структуру ПЭГ₄-(ПЭГ₄)₃ (hBU12-19).

Фиг. 18. Фармакокинетический профиль (общая концентрация Ab в мкг/мл против времени в днях) крысы после однократной внутривенной 1 мг/кг дозы неконъюгированного не-таргетирующего антитела (h00), его конъюгатов, содержащих пегелированные каркасы разной длины для его ПЭГ Группы, с группой лекарственное средство-линкер, представленной структурой MDpr-L^p-(ПЭГ)_x(PAV(glu)), где L^p представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x=0 (h00-14), где ПЭГ Группу по эpsilon-аминолизина замещают ацетилом, x имеет значение 2 (h00-43), 4 (h00-42), 8 (h00-18), 12 (h00-17) или 24 (h00-16).

Фиг. 19. Средний объем опухоли (мм³) против дней после трансплантации опухоли в модели CD19-положительной RL диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы после внутривенного введения одноразовой дозы 1 или 3 мг/кг hBU12 ADCs, содержащих пегилированные каркасы разной длины для их ПЭГ Групп, с лекарственным средством-линкером, представленным структурой MDpr-L^P-(ПЭГ)_x(PAB(gluc)), где L^P представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x=0 (hBU12-14), где ПЭГ Группу по эpsilon-аминолизуна замещают ацетилом, x имеет значение 2 (hBU12-43), 4 (hBU12-42), 8 (hBU12-18), 12 (hBU12-17) или 24 (hBU12-16), по сравнению с необработанными животными.

Фиг. 20. Концентрации лекарственного средства (нМ) в ксенотрансплантатах опухоли CD30⁺ L540су лимфомы Ходжкина у мышей после введения одноразовой дозы 1 мг/кг неpegилированного ADC, cAC10-[mc-PAB(gluc)MMAE]_p, (cAC10-1), параллельно-ориентированных пегилированных ADCs с лекарственным средством-линкером mc-L^P-(PAB (gluc)-MMAE) ПЭГ₂₄ (cAC10-10), MDpr-L^P- (PAB (gluc) -MMAE)ПЭГ₂₄ (cAC10-16), где параллельное Соединительное Звено L^P представляет собой лизин, или последовательно-ориентированного пегилированного ADC (cAC10-4), где ADC имеют среднюю нагрузку лекарственным средством, равную 8.

Фиг. 21. Переносимость, показанная как % изменения массы в динамике по времени, одноразовой внутривенной дозы 50 мг/кг не осуществляющих направленную доставку контрольных пегилированных конъюгатов лекарственных средств, содержащих пегилированные каркасы разной длины для их ПЭГ Групп, с лекарственным средством-линкером, представленным структурой MDpr-L^P-(ПЭГ)_x(PAB(gluc)), где L^P представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x=0 (h00-43), в которых ПЭГ Группу по эpsilon-аминолизуна замещают ацетилом, x имеет значение 2 (h00-43), 4 (h00-42), 8 (h00-18), 12 (h00-17) или 24 (h00-16), где ADC имеют среднюю нагрузку лекарственным средством равную 8, по сравнению с необработанными животными.

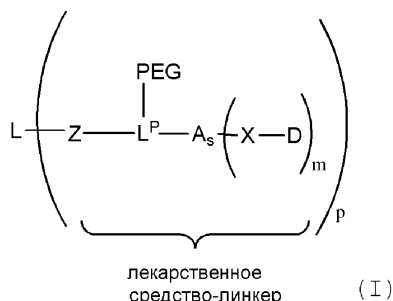
Фиг. 22. Хроматограммы, полученные методом эксклюзионной хроматографии (SEC), для не осуществляющих направленную доставку контрольных пегилированных конъюгатов лекарственных средств, содержащих пегилированные каркасы разной длины для их ПЭГ Групп, с лекарственным средством-линкером, представленной структурой MDpr-L^P-(ПЭГ)_x(PAB(gluc)), где L^P представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x имеет значение 8 (h00-18), 12 (h00-17) или 24 (h00-16)

Фиг. 23. Период полувыведения и дистрибуция, соответствующие двух-компарментной модели для не осуществляющих направленную доставку контрольных пегилированных конъюгатов лекарственных средств, содержащих пегилированные каркасы разной длины для их ПЭГ Групп, с лекарственным средством-линкером, представленной структурой MDpr-L^P-(ПЭГ)_x(PAB(gluc)), где L^P представляет собой лизин в качестве параллельного соединительного звена, где x имеет значение 8 (h00-18), 12 (h00-17) или 24 (h00-16)

Сущность изобретения

Изобретение обеспечивает, в числе прочего, конъюгаты лиганд-лекарственное средство (LDC), способы их получения и использования и их промежуточные соединения. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство являются стабильными в системе кровообращения, но при этом способны вызывать клеточную гибель клеток-мишеней или ингибирование пролиферации клеток-мишеней как только их лекарственный груз высвобождается вблизи или в самих клетках-мишенях.

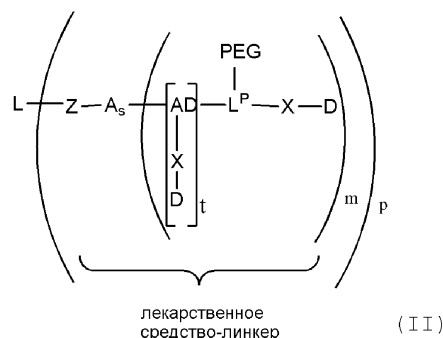
В основных вариантах осуществления, LDC по настоящему изобретению представлен структурой формулы I ниже



где D представляет собой группу лекарственного средства, PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля, которая маскирует гидрофобность лекарственного средства-линкера, L^P представляет собой параллельное соединительное звено, которое позволяет ПЭГ группе находиться в параллельной ориентации относительно X-D, A представляет собой разветвляющуюся группу, когда m имеет значение больше чем 1, необязательно состоящую из субъединиц, или A отсутствует, когда m имеет значение 1, X представляет собой высвобождаемую комплексную группу, которая обеспечивает высвобождение каждой группы D из LDC, и Z представляет собой необязательную спейсерную группу, через которую L^P связан с L, который представляет собой осуществляющий направленную доставку лиганд.

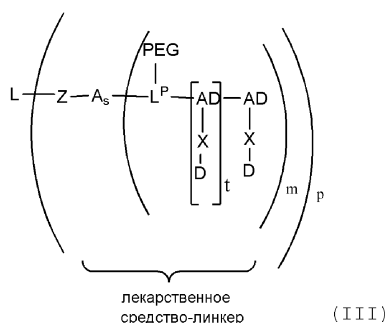
В других основных вариантах осуществления LDC по настоящему изобретению представлен струк-

турой формулы II ниже



где AD представляет собой группу присоединения лекарственного средства, которая обеспечивает возможность дополнительного присоединения X-D компонентов, как указано индексом t, в параллельной ориентации относительно ПЭГ группы, и L, L^p, Z, A, X, D, m, p и s имеют значения, определенные для формулы I

В других основных вариантах осуществления LDC по настоящему изобретению представлен структурой формулы III ниже



где AD, L, L^p, PEG, Z, A, X, D, m, p, s и t имеют значения, определенные для формулы II.

Описание изобретения

Общая информация

Настоящее изобретение основано, частью, на удивительном открытии, что ориентация полиэтиленгликолевого компонента (ПЭГ Группа) конъюгата лиганд-лекарственное средство может иметь огромное влияние на получаемую в результате фармакокинетику конъюгата. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что параллельное размещение ПЭГ Группы по отношению к группе лекарственного средства конъюгата лиганд-лекарственное средство может улучшить фармакокинетику конъюгата по сравнению с конъюгатами, которые либо не содержат ПЭГ группу, либо в которых ПЭГ группа находится в последовательной ориентации с группой лекарственного средства. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что количество повторяющихся субъединиц полиэтиленгликоля, присутствующих в ПЭГ группе, влияет на получаемую в результате фармакокинетику конъюгата. Конструируя конъюгаты таким образом, чтобы они содержали ПЭГ группу в параллельном расположении и подходящего размера для маскирования гидрофобности лекарственного средства и, в некоторых случаях, компонентов линкера, можно получить форматы конъюгатов лиганд-лекарственное средство, которые обеспечивают возможность более высокой нагрузки лекарственным средством, сохраняя при этом другие характеристики конъюгатов с более низкой нагрузкой, такие как благоприятные фармакокинетические свойства. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство также конструируют таким образом, что они высвобождали "свободное" лекарственное средство.

Определения

Если не указано иное, следующие термины и фразы, используемые в настоящей заявке, имеют следующие значения. Когда в настоящей заявке используют торговые названия, торговое название включает лекарственную форму продукта, непатентованное лекарственное средство и активный фармацевтический ингредиент (ингредиенты) имеющего такое торговое название продукта, если из контекста не следует иное.

"Параллельное соединительное звено", в контексте настоящего изобретения, относится к разветвленному компоненту линкерной группы, который соединяет ПЭГ группу в параллельной ориентации с Группой лекарственного средства. В контексте настоящего изобретения, фраза "параллельная ориентация", "параллельное размещение", "параллельное соединение" и подобные относится к конфигурации, где параллельно-размещенные или параллельно-ориентированные или параллельно-соединенные компоненты связаны с параллельным соединительным звеном (L^p) таким образом, что каждый имеет один конец, связанный с L^p, и один свободный конец. Типично L^p соединяет группу лекарственного средства через один или несколько компонентов линкерной группы, из которых один (или единственный) пред-

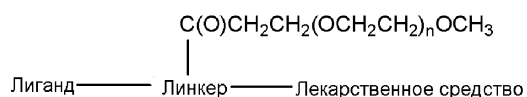
ставляет собой высвобождаемую комплексную группу, и ПЭГ группу таким образом, чтобы группа лекарственного средства и ПЭГ группа находились в параллельной ориентации, чтобы гидрофобность группы лекарственного средства маскировалась ПЭГ группой. В некоторых аспектах, обеспечивается дополнительное разветвление при помощи одной или нескольких групп присоединения лекарственного средства (ADs), которые связаны с L^P так, чтобы группа лекарственного средства, связанная с AD, находилась в параллельной ориентации относительно ПЭГ группы в этом L^P . Только те ПЭГ группы, которые необходимы для маскирования гидрофобности данной группы линкер-лекарственное средство, должны находиться в параллельной ориентации со своей группой лекарственного средства, и нет никакой необходимости, чтобы все из групп лекарственного средства и полиэтиленгликоля, связанные с L^P , находились в параллельной ориентации друг с другом.

Термин "параллельный" используется в настоящей заявке для обозначения ответвления двух компонентов конъюгата лиганд-лекарственное средство (LDC) от L^P , входящего в состав LDC, и не используется для указания, что два компонента расположены бок-о-бок в пространстве или имеют одинаковое расстояние между ними по некоторой или по всей их длине. В случаях, когда параллельно-ориентированный компонент сам является разветвленным и, таким образом, имеет множество концов, он тем не менее имеет только один связанный конец.

LDC, содержащий ПЭГ группу, которая находится в параллельной ориентации по отношению к группе лекарственного средства этого LDC, относится к LDC, включающему ПЭГ группу, которая имеет один конец, который связан с компонентом линкерной группы (т.е. Параллельным Соединительным Звеном), и один или несколько свободных несвязанных концов. Свободный несвязанный конец ПЭГ группы может иметь форму, например, непрореагировавшей функциональной группы, например, алкокси, карбоновой кислоты, алкиленкарбоновой кислоты, спирта или другой функциональной группы. Параллельная ориентация ПЭГ Группы по отношению к Группе лекарственного средства минимизирует количество атомов между Группой лиганда и Группой лекарственного средства, поскольку атомы ПЭГ Группы не вклиниваются между Группой лекарственного средства и Группой лиганда. В LDCs, линкерная Группа имеет в своем составе высвобождаемую комплексную группу, способную высвободить группу биологически активного лекарственного средства из LDC на целевом участке (например, через внутриклеточное расщепление). В некоторых случаях, группа лекарственного средства, которая высвобождается, представляет собой исходное лекарственное средство, которое было включено в группу лекарственного средства, и, таким образом, не остается связанной с ПЭГ группой или продуктом разложения Группы лиганда. В других случаях, биологически активная группа лекарственного средства, которая высвобождается, представляет собой исходное лекарственное средство, содержащее оставшуюся часть линкерной группы (отличную от ПЭГ группы).

Компонент линкерной группы, имеющий механизм высвобождения, который указан как высвобождаемая комплексная группа, встроен между L^P и группой лекарственного средства. Также как в случае с ПЭГ группой, группа лекарственного средства имеет один конец, который присоединен (пусть даже опосредованно через высвобождаемую комплексную группу) к параллельному соединительному звену, и один или несколько свободных несвязанных концов (или, в случае некоторых циклических лекарственных средств, отсутствие свободных концов).

Иллюстративное графическое представление LDC, содержащего ПЭГ группу, которая находится в параллельной (т.е. разветвленная) ориентации по отношению к группе лекарственного средства, является следующим:



Фраза "последовательная ориентация" или "последовательное размещение" или "последовательное соединение" относится к конфигурации компонента в LDC, где последовательно-ориентированный компонент присоединяется таким образом, чтобы он имел два связанных конца, при этом эти концы, каждый, связаны с разными компонентами LDC. LDC, содержащий ПЭГ группу, которая находится в последовательной ориентации по отношению к группе лиганда и группе лекарственного средства этого LDC, относится к LDC, включающему ПЭГ группу, которая связана с лигандом на одном конце (типично опосредованно через компоненты линкерной группы) и с группой лекарственного средства на другом конце (типично опосредованно через другие компоненты линкерной группы). Последовательное размещение ПЭГ группы увеличивает количество атомов между группой лиганда и группой лекарственного средства, поскольку по меньшей мере некоторые из атомов ПЭГ группы расположены между группой лекарственного средства и группой лиганда. Например, одна или несколько $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ субъединиц, которые характеризуют ПЭГ группу, вставлены между группой лекарственного средства и группой лиганда. Иллюстративное графическое представление конъюгата Лиганд-Лекарственное средство, содержащего ПЭГ группу, которая находится в последовательной ориентации по отношению к группе лиганда и группе лекарственного средства, является следующим:

Лиганд- Z_1 -(OCH_2CH_2) $_n$ - Z_2 -лекарственное средство, где Z_1 и Z_2 представляют собой необязательные

расширяющие компоненты линкерной группы.

Термин "антитело", в контексте настоящего изобретения, используется в самом широком смысле и специально охватывает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, которые демонстрируют желаемую биологическую активность, при условии, что фрагмент антитела содержит необходимое количество сайтов присоединения для лекарственного средства-линкера. Нативная форма антитела представляет собой тетрамер и состоит из двух одинаковых пар цепей иммуноглобулина, при этом каждая пара содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре, переменные области легкой и тяжелой цепей (VL и VH) вместе прежде всего ответственны за связывание с антигеном. Переменные области легкой и тяжелой цепей состоят из каркасной области, прерываемой тремя гиперпеременными областями, также называемыми "определяющими комплементарность областями" или "CDRs". Константные области могут распознаваться и взаимодействовать с иммунной системой. (см., например, Janeway et al., 2001, *Immuno. Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антитело может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Антитело может происходить из любого подходящего вида. В некоторых аспектах, антитело имеет человеческое или мышиное происхождение. Антитело может быть, например, человеческим, гуманизированным или химерным.

Термин "моноклональное антитело", в контексте настоящего изобретения, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными против одного антигенного сайта. Определение "моноклональное" указывает на характеристику антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должно рассматриваться как требующее получение антитела каким-либо конкретным способом.

"Интактное антитело" представляет собой такое антитело, которое включает антиген-связывающую переменную область, а также константную область легкой цепи (C_L) и константные области тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4} , в зависимости от класса антитела. Константные области могут представлять собой константные области нативной последовательности (например, константные области человеческой нативной последовательности) или их вариант аминокислотной последовательности.

"Фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, включающую его антигенсвязывающую или переменную область. Чтобы его можно было использовать в настоящем изобретении, фрагмент антитела должен содержать необходимое количество сайтов для присоединения к лекарственному средству-линкеру. Сайты присоединения могут быть природного происхождения или не природного происхождения.

"Антиген" представляет собой единицу, с которой антитело связывается специфическим образом.

Термины "специфическое связывание" и "специфически связывается" означают, что антитело или производное антитела будет связываться, высокоселективным образом, с его соответствующим антигеном-мишенью, а не с большим количеством других антигенов. Типично, антитело или производное антитела связывается с аффинностью по меньшей мере около 1×10^{-7} М и предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М, и связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая по крайней мере в два раза больше, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличным от предварительно определенного антигена или близкородственного антигена.

Термин "ингибировать" или "ингибирование" означает уменьшение на поддающееся измерению количество или полное предотвращение.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству конъюгата, эффективному для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего. В случае рака, терапевтически эффективное количество конъюгата может уменьшать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферийные органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли;

ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных с раком. В той степени, в которой лекарственное средство может ингибировать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака, эффективность, например, можно измерить путем определения времени до прогрессирования заболевания (ТТР) и/или определения процента положительного клинического ответа (RR).

Если из контекста не следует иное, термин "существенный" или "по существу" относится к большей части, т.е. $>50\%$ популяции, смеси или образца, предпочтительно больше чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% популяции.

Термины "внутриклеточно расщепляемый" и "внутриклеточное расщепление" относятся к метабо-

лическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгат лиганд-лекарственное средство (например, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) или т.п.), в результате чего ковалентное присоединение, между группой лекарственного средства (D) и группой лиганда (например, антителом (Ab)) разрушается, например, под действием высвобождаемой комплексной группы, приводя к диссоциации свободного лекарственного средства из LDC, включая его продукты разложения, внутри клетки. Вещества, образующиеся в результате такой диссоциации, представляют собой, таким образом, внутриклеточные метаболиты.

Термин "цитотоксическая активность" относится к эффекту киллинга клеток, осуществляемому лекарственным средством или конъюгатом лиганд-лекарственное средство или внутриклеточным метаболитом конъюгата лиганд-лекарственное средство.

Цитотоксическая активность может быть выражена IC_{50} значением, которое представляет собой концентрацию (молярную или массовую) на единицу объема, при которой половина клеток выживает после воздействия цитотоксического средства.

Термин "цитостатическая активность" относится к антипролиферативному эффекту, отличному от киллинга клеток, цитостатического средства или конъюгата лиганд-лекарственное средство, содержащего цитостатическое средство в качестве его группы лекарственного средства, или его внутриклеточного метаболита, где метаболит представляет собой цитостатическое средство.

Термин "цитотоксическое средство", в контексте настоящего изобретения, относится к веществу, которое обладает цитотоксической активностью и вызывает деструкцию клеток. Термин предусматривает включение радиоактивных изотопов (например, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтических средств и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

Термин "цитостатическое средство", в контексте настоящего изобретения, относится к веществу, которое обладает цитостатической активностью, например, ингибирует функцию клеток, ответственных за клеточный рост или размножение или способствующих этому. Цитостатические средства включают ингибиторы, такие как ингибиторы белков, например, ингибиторы ферментов.

Термины "рак" и "раковый" относятся к физиологическому состоянию или расстройству у млекопитающих или описывают такое состояние или расстройство, которое типично характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. "Опухоль" включает одну или несколько раковых клеток.

"Аутоиммунное заболевание", в контексте настоящей заявки, представляет собой заболевание или расстройство, возникающее из, и направленное против, собственных тканей или белков индивидуума.

"Пациент", в контексте настоящего изобретения, относится к субъекту, которому вводят LDC. Примеры "пациента" включают, но не ограничиваются этим, человека, крысу, мышшь, морскую свинку, отличного от человека примата, свинью, козу, корову, лошадь, собаку, кошку, птицу или дичь. Типично, пациент представляет собой крысу, мышшь, собаку, отличного от человека примата или человека. В некоторых аспектах, пациент представляет собой человека, нуждающегося в эффективном количестве LDC.

Термины "лечить" или "лечение", если из контекста не следует иное, относятся к терапевтическому лечению и профилактическим мерам для предотвращения рецидива, где целью является ингибирование или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как, например, развитие или распространение рака. Для целей настоящего изобретения, благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение симптомов, уменьшение степени развития заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) болезненного состояния, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение тяжести или временное облегчение заболевания и ремиссию (частичную или полную), вне зависимости от того, поддается или нет это обнаружению. "Лечение" также может означать продление срока выживания по сравнению с прогнозируемым выживанием, если не принимать лечение. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают тех, которые уже имеют такое состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к такому состоянию или расстройству.

В контексте рака, термин "лечение" включает любое или все из следующих: ингибирование роста опухолевых клеток, раковых клеток или опухоли; ингибирование репликации опухолевых клеток или раковых клеток, уменьшение общей опухолевой нагрузки или уменьшение количества раковых клеток и уменьшение тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием.

В контексте аутоиммунного заболевания, термин "лечение" включает любое или все из следующих: ингибирование репликации клеток, ассоциированных с аутоиммунным заболеванием, включая, но не ограничиваясь этим, клетки, которые продуцируют аутоиммунное антитело, уменьшение нагрузки аутоиммунных антител и уменьшение тяжести одного или нескольких симптомов аутоиммунного заболевания.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль", в контексте настоящего изобретения, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения (например, лекарственного средства, лекарственного средства-линкера или конъюгата лиганд-Лекарственное средство). Соединение может содержать по меньшей мере одну амино группу, и, соответственно, кислотно-

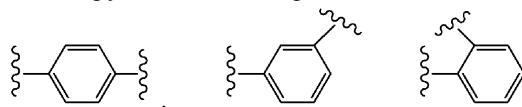
аддитивные соли могут быть образованы с амино группой. Примеры солей включают, но не ограничиваются этим, сульфат, трифторацетат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может предполагать включение другой молекулы, такой как ацетатный ион, сукцинатный ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую группу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может содержать более одного заряженного атома в своей структуре. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут включать несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может содержать один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Если не указано иное, термин "алкил", как таковой или как часть другого термина, относится к замещенному или незамещенному, линейному или разветвленному, насыщенному или ненасыщенному углеводороду, содержащему указанное количество атомов углерода (например, "-C₁-C₈ алкил" или "-C₁-C₁₀" алкил относятся к алкильной группе, содержащей от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода, соответственно). Когда количество атомов углерода не указано, алкильная группа содержит от 1 до 8 атомов углерода. Репрезентативные линейные "-C₁-C₈ алкильные" группы включают, но не ограничиваются этим, -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил, -н-гексил, -н-гептил и -н-октил; тогда как разветвленные -C₁-C₈ алкилы включают, но не ограничиваются этим, -изопропил, -втор-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил и -2-метилбутил; ненасыщенные -C₂-C₈ алкилы включают, но не ограничиваются этим, -винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил, -1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, -ацетиленил, -пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил. В некоторых аспектах алкильная группа является незамещенной. Алкильная группа может быть замещена одной или несколькими группами. В других аспектах, алкильная группа будет насыщенной.

Если не указано иное, "алкилен", как таковой или как часть другого термина, относится к замещенному или незамещенному, насыщенному или ненасыщенному, разветвленному или линейному или циклическому углеводородному радикалу, содержащему указанное количество атомов углерода, типично 1-10 атомов углерода, и содержащему два одновалентных радикальных центра, образованных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают, но не ограничиваются этим: метилен (-CH₂-), 1,2-этил (-CH₂CH₂-), 1,3-пропил (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-бутил (-CH₂CH₂CH₂CH₂-) и т.п. В предпочтительных аспектах, алкилен представляет собой разветвленный или линейный углеводород (т.е. он не является циклическим углеводородом). В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, алкилен может представлять собой насыщенный алкилен.

Если не указано иное, "арил", как таковой или как часть другого термина, означает замещенный или незамещенный одновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал, содержащий 6-20 атомов углерода (предпочтительно 6-14 атомов углерода), образованный путем удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в приведенных в качестве примера структурах как "Ar". Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются этим, радикалы, образованные из бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и т.п. Примером арильной группы является фенильная группа.

Если не указано иное, "арилен", как таковой или как часть другого термина, представляет собой арильную группу, определенную выше, где один из атомов водорода арильной группы замещен связью (т.е. является двухвалентным), и может быть в орто, мета или пара ориентациях, как показано в следующих структурах, и иллюстративной группой является фенил:



В выбранных вариантах осуществления, например, когда параллельное соединительное звено, разветвляющаяся группа или группа присоединения лекарственного средства включает арилен, этот арилен представляет собой арильную группу, определенную выше, где один или два из атомов водорода арильной группы замещены связью (т.е. арилен может быть двухвалентным или трехвалентным).

Если не указано иное, "C₃-C₈ гетероцикл", как таковой или как часть другого термина, относится к одновалентной замещенной или незамещенной, ароматической или не-ароматической, моноциклической или бициклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 8 атомов углерода (также называемых кольцевыми членами) и от одного до четырех гетероатомов в качестве кольцевых членов, независимо вы-

бренных из N, O, P или S, и образованной путем удаления одного атома водорода от кольцевого атома исходной кольцевой системы. Один или несколько N, S или O атомов в гетероцикле могут быть окислены. Кольцо, которое включает гетероатом, может быть ароматическим или не-ароматическим. Если не указано иное, гетероцикл связан с его боковой группой по любому гетероатому или атому углерода, что приводит к стабильной структуре. Репрезентативные примеры C₃-C₈ гетероцикла включают, но не ограничиваются этим, пирролидинил, азетидинил, пиперидинил, морфолинил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бензофуранил, бензотиофен, индолил, бензопиразолил, пирролил, тиофенил (тиофен), фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, пиримидинил, пиридинил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил и изоксазолил.

Если не указано иное, "C₃-C₈ гетероцикло", как таковой или как часть другого термина, относится к C₃-C₈ гетероциклической группе, определенной выше, где один из атомов водорода гетероциклической группы замещен связью (т.е. он является двухвалентным). В выбранных вариантах осуществления, например, когда параллельное соединительное звено, разветвляющаяся группа или группа присоединения лекарственного средства включает гетероцикло, гетероцикло представляет собой гетероциклическую группу, определенную выше, где один или два из атомов водорода гетероциклической группы замещены связью (т.е. гетероцикло может быть двухвалентным или трехвалентным).

Если не указано иное, "C₃-C₈ карбоцикло", как таковой или как часть другого термина, представляет собой 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членное одновалентное замещенное или незамещенное, насыщенное или ненасыщенное не-ароматическое моноциклическое или бициклическое карбоциклическое кольцо, образованное путем удаления одного атома водорода от кольцевого атома исходной кольцевой системы. Репрезентативные -C₃-C₈ карбоциклы включают, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил.

Если не указано иное, "C₃-C₈ карбоцикло", как таковой или как часть другого термина, относится к C₃-C₈ карбоциклической группе, определенной выше, где один из атомов водорода карбоциклической группы замещен связью (т.е. он является двухвалентным). В выбранных вариантах осуществления, например, когда параллельное соединительное звено, разветвляющаяся группа или группа присоединения лекарственного средства включает карбоцикло, карбоцикло представляет собой карбоциклическую группу, определенную выше, где один или два из атомов водорода карбоциклической группы замещены связью (т.е. карбоцикло может быть двухвалентным или трехвалентным).

Если не указано иное, термин "гетероалкил", как таковой или в комбинации с другим термином, означает, если не указано иное, стабильный углеводород с прямой или разветвленной цепью или их комбинацией, полностью насыщенный или содержащий от 1 до 3 степеней ненасыщенности, состоящий из указанного количества атомов углерода и от одного до десяти, предпочтительно от одного до трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы, необязательно, могут быть окислены, и гетероатом азота, необязательно, может быть кватернизирован. Гетероатом (гетероатомы) O, N и S могут находиться в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, по которому алкильная группа присоединяется к остальной части молекулы. Гетероатом Si может находиться в любом положении гетероалкильной группы, включая положение, по которому алкильная группа присоединяется к остальной части молекулы. Примеры включают -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-O-CH₃ и -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Вплоть до двух гетероатомов могут быть расположены последовательно друг за другом, например, -CH₂-NH-OCH₃ и -CH₂-O-Si(CH₃)₃. В предпочтительных вариантах осуществления, C₁-C₄ гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 4 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома, и C₁-C₃ гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 3 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома. В некоторых аспектах, гетероалкил или гетероалкилен является насыщенным.

Если не указано иное, термин "гетероалкилен" как таковой или как часть другого заместителя, означает двухвалентную группу, образованную из гетероалкила (обсуждаемого выше), и в качестве примеров можно указать -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- и -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Что касается гетероалкиленовых групп, гетероатомы также присутствуют на любом или на обоих концах цепи. Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп не подразумевается никакая ориентация связывающей группы. В выбранных вариантах осуществления, например, когда параллельное соединительное звено, разветвляющаяся группа или группа присоединения лекарственного средства включает гетероалкилен, этот гетероалкилен представляет собой гетероалкильную группу, определенную выше, где один или два из атомов водорода гетероалкильной группы замещены связью (т.е. гетероалкилен может быть двухвалентным или трехвалентным).

"Замещенный алкил" и "замещенный арил" означают алкил и арил, соответственно, в котором один или несколько атомов водорода, каждый независимо, замещены заместителем. Типичные заместители включают, но не ограничиваются этим, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R, -C(=O)X,

$-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $C(=O)SR$, $C(=S)SR$, $C(=O)NR_2$, $C(=S)NR_2$ или $C(=NR)NR_2$, где каждый X независимо представляет собой галоген: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R независимо представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_6-C_{20}$ арил, $-C_3-C_{14}$ гетероцикл, защитную группу или группу пролекарства. Типичные заместители также включают (=O). Группы алкилен, карбоцикл, карбоцикло, арилен, гетероалкил, гетероалкилен, гетероцикл и гетероцикло, описанные выше, также могут быть аналогичным образом замещены.

Как используется в настоящей заявке, термин "свободное лекарственное средство" относится к биологически активной группе лекарственного средства, которая не является ковалентно присоединенной, либо непосредственно либо опосредованно, к ПЭГ группе или к продукту разложения группы лиганда. Свободное лекарственное средство может относиться к лекарственному средству, в том виде, как оно существует сразу после отщепления от линкерной группы через механизм высвобождения, который обеспечивается высвобождаемой комплексной группой в LDC, или к последующему внутриклеточному преобразованию или метаболизму. В некоторых аспектах, свободное лекарственное средство будет иметь форму H-D или может существовать в виде заряженной группы. Свободное лекарственное средство представляет собой фармакологически активное соединение, которое может обеспечивать желаемый биологический эффект. В некоторых аспектах, фармакологически активное соединение не является исходным лекарственным средством, а может включать компонент линкерной группы, который не подвергался последующему внутриклеточному метаболизму.

Соединения-конъюгаты лиганд-лекарственное средство и соответствующие промежуточные соединения

Настоящее изобретение основано, частью, на открытии, что у конъюгатов лиганд-лекарственное средство (LDCs), которые имеют неблагоприятные фармакокинетические свойства, эти фармакокинетические свойства можно улучшить путем размещения ПЭГ Группы в параллельной ориентации относительно группы лекарственного средства, как описано в настоящей заявке. В некоторых аспектах, профиль клиренса пегилированных конъюгатов такой же, как у неконъюгированного лиганда (т.е. агента направленной доставки, такого как антитело или соответствующий антиген-связывающий фрагмент), даже при высоком содержании лекарственного средства. LDCs включают группу лиганда (т.е. осуществляющий направленную доставку лиганд), линкерную группу и группу лекарственного средства. Линкерная группа до или после ее присоединения к осуществляющему направленную доставку лиганду соединяет группу лекарственного средства с группой лиганда и включает в себя ПЭГ группу в параллельной конфигурации по отношению к группе лекарственного средства. Такая параллельная конфигурация является результатом присоединения группы лекарственного средства, через высвобождаемую комплексную группу, и ПЭГ группы к параллельному соединительному звену. Линкерная группа, когда она связана с группой лекарственного средства, может быть указана как лекарственное средство-линкер. Популяция LDCs предпочтительно будет иметь среднюю нагрузку группами лекарственное средство-линкер по меньшей мере около 6, около 7 или около 8 групп лекарственное средство-линкер на группу лиганда.

ПЭГ группы рассчитаны таким образом, чтобы они обеспечивали оптимальный уровень маскирования гидрофобности гидрофобных компонентов лекарственного средства-линкера. Поэтому включение ПЭГ группы, как раскрывается в настоящей заявке, является особенно подходящим для лекарственных средств-линкеров, которые иначе будут иметь достаточную гидрофобность для негативного влияния на фармакокинетику получаемого конъюгата по сравнению с неконъюгированным лигандом. Такие более низкие фармакокинетические свойства включают более высокий плазменный клиренс. Таким образом, конъюгаты лиганда с лекарственным средством, которые демонстрируют существенно более высокий плазменный клиренс и соответственно более низкое содержание вещества в плазме крови по сравнению с неконъюгированным Лигандом, будут полезными в настоящем изобретении.

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство имеют более благоприятные фармакокинетические свойства благодаря параллельной ориентации группы лекарственного средства и ПЭГ группы в гидрофобной части лекарственное средство-линкер, посредством чего негативное влияние гидрофобности группы лекарственного средства и/или других компонентов лекарственное средство-линкер части на плазменный клиренс уменьшается или устраняется (т.е. гидрофобность лекарственное средство-линкер части маскируется). Параллельную ориентацию обеспечивают при помощи параллельного соединительного звена (L^P), поскольку параллельное соединительное звено действует, соединяя группу лекарственного средства, ПЭГ группу и лиганд в подходящей разветвляющейся конфигурации, обеспечивая необходимую параллельную ориентацию. Параллельное соединительное звено можно считать каркасом, содержащим участки присоединения для компонентов конъюгатов, которые могут быть мультиплексированы, чтобы иметь несколько групп лекарственного средства в параллельной ориентации с ПЭГ группами, для обеспечения пегилированного мультиплексного каркаса. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный компонент в лекарственное средство-линкер части, гидрофобность которого маскируется параллельно-ориентированной ПЭГ группой, представляет собой гидрофобную группу лекарственного средства.

Группа лекарственного средства присоединяется к параллельному соединительному звену через высвобождаемую комплексную группу. Высвобождаемая комплексная группа обеспечивает возмож-

ность эффективного высвобождения лекарственного средства у клетки-мишени, достаточного, чтобы вызвать, например, цитотоксичность или цитостатическую. Типично, высвобождаемая комплексная группа рассчитана для эффективного высвобождения свободного лекарственного средства как только конъюгат интернализируется в клетке-мишени, но также рассчитана для высвобождения свободного лекарственного средства в непосредственной близости от клеток-мишеней. Подходящие сайты распознавания для расщепления представляют собой такие, которые делают возможным эффективное высвобождение содержащейся в LDC группы(групп) лекарственного средства. Типично, сайт распознавания представляет собой сайт пептидного расщепления (такой как в высвобождаемых комплексных группах на основе пептидов), сайт расщепления сахара (такой как в высвобождаемых комплексных группах на основе сахаров) или сайт дисульфидного расщепления (такой как в высвобождаемых комплексных группах на основе дисульфидов). Примеры сайтов пептидного расщепления включают сайты, распознаваемые внутриклеточными протеазами, такими как протеазы, присутствующие в лизосомах. Примеры сайтов расщепления сахаров включают сайты, распознаваемые гликозидазами, включая глюкоуридазы, такие как бета-глюкоуридаза.

Любое биоактивное соединение (т.е. лекарственное средство) можно использовать в качестве группы лекарственного средства в настоящем изобретении. Биоактивное соединение может содержать подходящий участок для его включения в качестве группы лекарственного средства в LDC или может быть модифицировано для этой цели, при этом по существу сохраняя желаемую биологическую активность исходного лекарственного средства, когда модифицированное лекарственное средство, которое может сохранять или не сохранять часть линкерной группы, высвобождается из LDC. Предпочтительные группы лекарственного средства обеспечивают высвобождение исходного биоактивного соединения. Группа лекарственного средства может представлять собой ауристатиновое или не-ауристатиновое лекарственное средство, которое является гидрофобным компонентом лекарственного средство-линкер части, гидрофобность которого следует маскировать параллельно-ориентированной группой лекарственного средства. Эффекты настоящего изобретения будут более отчетливо выражены в вариантах осуществления, где группа лекарственного средства, высвобождаемая комплексная группа или комбинация группы лекарственного средства/высвобождаемой комплексной группы являются гидрофобными по своей природе, негативно влияя, таким образом, на фармакокинетику получаемого конъюгата. Примеры гидрофобных лекарственных средств включают монометил ауристин Е и лекарственные средства, имеющие гидрофобность, которая сопоставима или больше чем у монометил ауристина Е. Примеры гидрофобных Высвобождаемых Комплексных Групп включают Высвобождаемые Комплексные группы на основе пептидов и сахаров, которые содержат гидрофобный саморасщепляющийся компонент, специально проиллюстрированный в настоящей заявке, также как и Высвобождаемые Комплексные группы, имеющий гидрофобность сопоставимую или больше чем у таких Высвобождаемых Комплексных Групп.

Гидрофобность можно измерить с использованием SlogP. SlogP определяется как \log коэффициента разделения октанол/вода (включая подразумеваемые водороды), и может быть рассчитан с использованием программы MOE™ от Chemical Computing group (SlogP значения, рассчитанные в соответствии с Wildman, S.A., Crippen, G.M.; Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 39 No. 5 (1999) 868-873). Когда ссылаются на группу лекарственного средства или высвобождаемую комплексную группу, имеющую гидрофобность, сопоставимую с эталонной группой лекарственного средства или высвобождаемой комплексной группой, SlogP значение будет в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10%, от SlogP значения эталонной группы лекарственного средства или высвобождаемой комплексной группы.

В свете вышеизложенного настоящее изобретение обеспечивает, в одной группе вариантов осуществления, композицию конъюгатов лиганд-лекарственное средство, включающую популяцию конъюгатов лиганд-лекарственное средство. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство включают группу лиганда и несколько групп лекарственного средство-линкер, присоединенных к ней. Предпочтительно в среднем присутствуют от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 6 до около 10, от около 8 до около 14, от около 8 до около 12, от около 8 до около 10 лекарственного средство-линкер групп на Лиганд в композиции. Примером присоединения к лиганду является присоединение через тиоэфирные связи. Примерами сайтов конъюгации на лиганде являются тиольные группы, полученные в результате восстановления межцепевых дисульфидных остатков и/или тиол-содержащих остатков, встроенных в лиганд, таких как встроенные цистеины. Присоединение может быть, например, через тиольные остатки, образованные из межцепевого дисульфида и из 0-8 встроенных цистеиновых остатков.

В соответствующей группе вариантов осуществления обеспечиваются способы введения конъюгатов лиганд-лекарственное средство пациенту для лечения заболевания. Заболевание может представлять собой, например, рак или аутоиммунное заболевание.

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство вводят в терапевтически эффективном количестве и по терапевтически эффективной схеме.

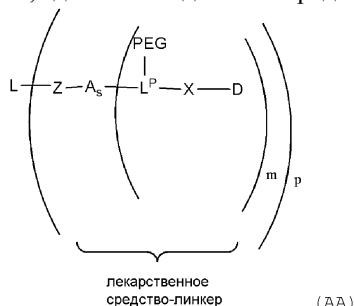
Варианты осуществления

Различные варианты осуществления изобретения описаны ниже, с последующим более подробным обсуждением компонентов для получения конъюгатов лиганд-лекарственное средство и их промежуточ-

ных соединений. Любые из выбранных вариантов осуществления для компонентов конъюгатов лиганд-лекарственное средство и их промежуточных соединений могут относиться ко всем без исключения аспектам изобретения, описанного в настоящей заявке, или они могут относиться к одному аспекту. Отдельные варианты осуществления можно объединять вместе в любой комбинации.

Соединения-конъюгаты лиганд-лекарственное средство

В одной группе вариантов осуществления обеспечиваются LDC соединения, способные высвободить свободное лекарственное средство, где LDC соединение представлено формулой AA ниже:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

L представляет собой группу лиганда;

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z представляет собой расширяющую группу;

X представляет собой высвобождаемую комплексную Группу;

L^p представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до около 12);

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2; и

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

В другой группе вариантов осуществления Формула AA представляет не индивидуальные LDC соединения, а LDC композицию (т.е. композицию, включающую популяцию индивидуальных LDC соединений). В таких вариантах осуществления, p представляет собой среднее количество лекарственных средств-линкеров на лиганд в композиции. В таких вариантах осуществления, p типично не является целочисленным значением и может находиться в пределах от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12). Другие переменные (например, L, Z, A, L^p, PEG, X, D, s и m) имеют определенное выше значение.

В другой группе вариантов осуществления LDC композиция включает популяцию LDC соединений, где индивидуальные LDC соединения представлены формулой AA, где для каждого индивидуального LDC соединения p независимо выбран из целого числа, имеющего значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до около 12), и среднее количество лекарственных средств-линкеров на лиганд в композиции составляет от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12).

В некоторых аспектах от 1 до 32 или от 2 до 32 (предпочтительно от 6 до 32 или от 8 до 32) групп лекарственного средства присоединены к каждой группе лиганда. Популяция конъюгатов лиганд-лекарственное средство может содержать в среднем от 1 до 32 или примерно от 2 до 32 (предпочтительно примерно от 6 до 32 или примерно от 8 до 32) групп лекарственного средства на лиганд.

Отдельные варианты осуществления LDC соединений или LDC композиций, представленных формулой AA, включают такие, в которых:

1) m имеет значение 1, и s имеет значение 0;

2) m имеет значение от 2 до 4, и s имеет значение 1;

3) m имеет значение 2, и s имеет значение 1;

4) m имеет значение 1; s имеет значение 0; и p представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 14, от 8 до 14 или от 8 до 12 для LDC соединения, или p представляет собой число, имеющее значение от 6 до около 14, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12 для LDC композиции;

5) m имеет значение 2-4; s имеет значение 1 и p представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 14, от 8 до 14 или от 8 до 12 для LDC соединения, или p представляет собой число, имеющее значение от 6 до около 14, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12 для LDC композиции;

6) m имеет значение 2; s имеет значение 1; и p представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 14, от 8 до 14 или от 8 до 12 для LDC соединения; или p представляет собой число, имеющее значение от 6 до около 14, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12 для LDC композиции;

7) m имеет значение 2; s имеет значение 1; и p имеет значение 8

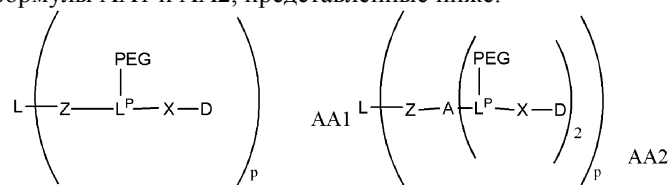
8) m имеет значение 1; s имеет значение 0; и p имеет значение 8

9) Любой из вариантов осуществления, описанных в пунктах 1-8 этого подраздела, где от 1 до 32 или примерно от 2 до 32

(предпочтительно от около 6 до около 32 или от около 8 до около 32) групп лекарственного средства присоединены к группе лиганда.

10) Любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-9 этого подраздела, где L^p представляет собой природную или имеющую неприродное происхождение аминокислоту, аминспирт, аминокальдегид или полиамин.

Отдельные варианты осуществления LDC соединений или LDC композиций, которые представлены формулой AA, имеют формулы AA1 и AA2, представленные ниже:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

L представляет собой группу лиганда;

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z представляет собой расширяющую группу;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^p представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой разветвляющуюся группу, которая присутствует; и

нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, и предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12) для соединения-конъюгата лиганд-лекарственное средство, или p представляет собой число, имеющее значение от 1 до около 14, и предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для композиции конъюгатов лиганд-лекарственное средство.

В любом из выбранных вариантов осуществления для LDC соединений, представленных в настоящей заявке, где p значение присутствует, включая варианты осуществления, описанные выше, p может представлять собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, от 2 до 14, от 2 до 10, от 4 до 12, от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 10. Индекс p может иметь значение 1 или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7 или 8, или 9, или 10, или 11, или 12, или 13, или 14.

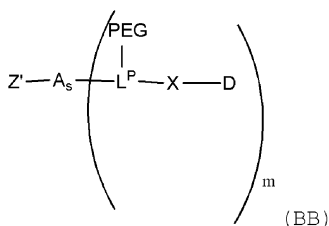
В любом из выбранных вариантов осуществления для LDC композиций, представленных в настоящей заявке, где p значение присутствует, включая варианты осуществления, описанные выше, p имеет значение от 1 до около 14, от около 2 до около 14, от около 2 до около 10, от около 4 до около 12, от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 12 или от около 8 до около 10. Индекс p может иметь значение 1 или около 1, или 2 или около 2, или 3 или около 3, или 4 или около 4, или 5 или около 5, или 6 или около 6, или 7 или около 7, или 8 или около 8, или 9 или около 9, или 10 или около 10, или 11 или около 11, или 12 или около 12, или 13 или около 13, или 14 или около 14.

В другой группе вариантов осуществления обеспечиваются конъюгаты лиганд-лекарственное средство (LDCs), способные высвобождать свободное лекарственное средство, где от одной до тридцати двух групп лекарственного средства (предпочтительно от 2 до 32 групп лекарственного средства, от 6 до 32 групп лекарственного средства, от 8 до 32 групп лекарственного средства, от 6 до 14 групп лекарственного средства, от около 8 до около 14 групп лекарственного средства или от около 8 до около 12 групп лекарственного средства) конъюгированы с осуществляющим направленную доставку лигандом в LDC через линкерные группы, где каждая группа лекарственного средства в лекарственное средство-линкер части присоединена к ее линкерной группе через расщепляемый компонент (т.е. высвобождаемую комплексную группу), который высвобождает свободное лекарственное средство вблизи от сайта, являющегося мишенью, на которую направлен лиганд (L), и где LDCs также включают параллельное соединительное звено (L^p), с которым связана группа лиганда, и группу полиэтиленгликоля (ПЭГ), где группы ПЭГ и лекарственного средства в части линкер-лекарственное средство связаны в параллельной ориентации друг с другом. Группа Полиэтиленгликоля содержит от 4 до 72 (предпочтительно от 6 до 72 повторяющихся $-OCH_2CH_2-$ звеньев, более предпочтительно от 6 до 36 или от 8 до 24) повторяющихся звеньев. Лиганд может представлять собой группу антитела, предпочтительно группу интактного антитела. Расщепляемый линкер может включать, например, сайт пептидного расщепления, сайт расщепления са-

хара или сайт дисульфидного расщепления. Лекарственное средство может представлять собой ауристин или не-ауристин. Ауристин или неауристин может иметь гидрофобность, которая сопоставима или больше чем у монометил ауристина E. Ауристин может представлять собой монометил ауристин E. В некоторых аспектах, ADC демонстрирует лучшие фармакокинетические свойства по сравнению с таким же или по существу таким же ADC, не содержащим ПЭГ группу или содержащим ПЭГ группу, но находящуюся в последовательной ориентации по отношению к антителу и лекарственному средству. В некоторых аспектах, ADC демонстрирует фармакокинетические свойства такие же или по существу такие же, как у антитела, когда оно не является конъюгированным компонентом.

Соединения лекарственное средство-линкер

В некоторых аспектах, при конструировании конъюгатов лиганд-лекарственное средство, желателно синтезировать полностью лекарственное средство-линкер до конъюгации с Группой Лиганда. В таких вариантах осуществления лекарственное средство-линкер соединения действуют как промежуточные соединения. Примеры соединений лекарственное средство-линкер представлены ниже, и их структура представлена формулой BB



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где D представляет собой группу лекарственного средства; PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля; Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^p представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2;

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение от 2 до 4.

Отдельные варианты осуществления формулы BB включают такие, в которых:

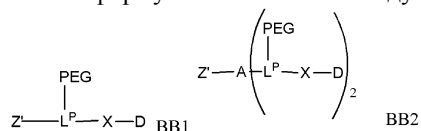
1) m имеет значение 1, и s имеет значение 0;

2) m имеет значение 2, 3 или 4 и s имеет значение 1;

3) m имеет значение 2 и s имеет значение 1;

4) Любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-3 этого подраздела, где L^p представляет собой природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту или полиамин.

Отдельные варианты осуществления формул BB включают следующие формулы:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^p представляет собой параллельное соединительное звено и

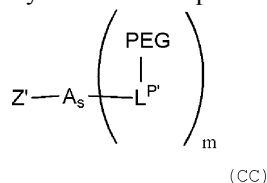
A представляет собой разветвляющуюся группу, которая присутствует.

Промежуточные линкерные соединения

В некоторых аспектах при конструировании конъюгатов лиганд-лекарственное средство может быть желательным конъюгировать компоненты линкера с группой лиганда (например, антителом) до присоединения -X-D компонента конъюгата лиганд-лекарственное средство. Например, в вариантах осуществления, где используют тиолсодержащий заместитель, например, цистеин, для присоединения -X-D компонента, возможно будет желательным конъюгировать компоненты линкера с группой лиганда (например, антителом) до присоединения -X-D компонента конъюгата лиганд-лекарственное средство. В некоторых таких вариантах осуществления, параллельное соединительное звено способно образовывать ковалентную связь с высвобождаемой комплексной группой, но еще не присоединено к ней. Параллельное соединительное звено может быть защищено защитными группами для упрощения синтеза. Защит-

ную группу можно удалить непосредственно перед присоединением к высвобождаемой комплексной группе.

Ниже представлены примеры промежуточных линкерных соединений, имеющих формулу CC:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к Группе Лиганда;

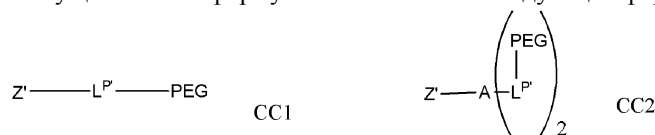
A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

L^{P'} представляет собой параллельное соединительное звено способное образовывать ковалентное присоединение к группе, высвобождающей лекарственное средство;

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2; и

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

Отдельные варианты осуществления формулы CC включают следующие формулы:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

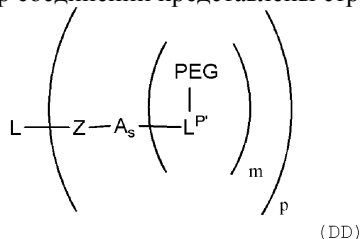
Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к Группе Лиганда;

-X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства;

A представляет собой разветвляющуюся группу и

L^{P'} представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D.

В некоторых аспектах промежуточные линкерные соединения будут конъюгированы с группой лиганда с образованием промежуточных лиганд-линкер соединений. Иллюстративные варианты осуществления промежуточных лиганд-линкер соединений представлены структурой, показанной ниже:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения где

L представляет собой группу лиганда;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z представляет собой расширяющую группу;

L^{P'} представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12);

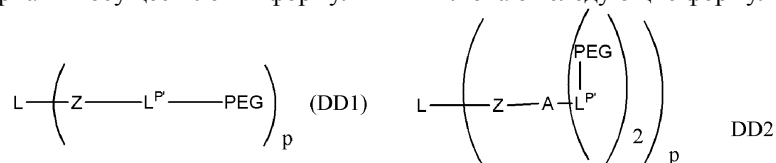
нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; предпочтительно 1 или 2 и

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

В другой группе вариантов осуществления формула DD представляет не индивидуальные промежуточные лиганд-линкер соединения, а композицию, включающую популяцию индивидуальных промежуточных лиганд-линкер соединений. В таких вариантах осуществления p представляет собой среднее ко-

личество промежуточных линкеров на лиганд в композиции. В таких вариантах осуществления, p типично не является целочисленным значением и может находиться в пределах от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12). Другие переменные (например, L , Z , A , L^P , PEG, s и m) имеют определенное выше значение.

Отдельные варианты осуществления формулы DD включают следующие формулы.



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения где

L представляет собой группу лиганда;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z - представляет собой расширяющую группу;

$-X-D$ представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к $-X-D$;

A представляет собой разветвляющуюся группу и

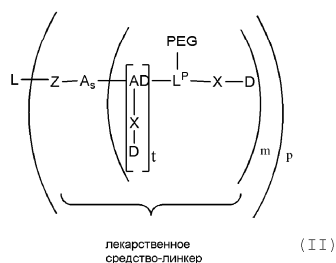
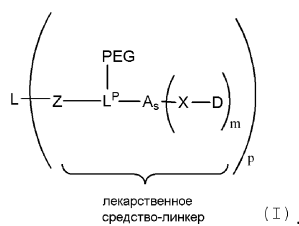
нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12) для промежуточного лиганд-линкер соединения, или индекс p представляет собой число, имеющее значение от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для промежуточной лиганд-линкер композиции.

Дополнительные варианты осуществления

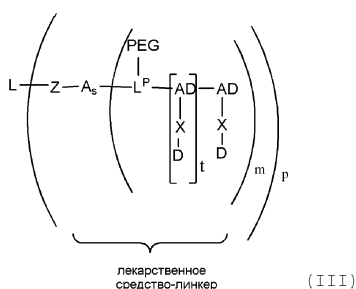
Конъюгаты формулы AA и их промежуточные соединения обеспечивают возможность включения одной группы лекарственного средства на ПЭГ группу, соотношение 1:1. Возможно будет желательным, однако, обеспечить конъюгаты лекарственных средств, содержащие либо 1 лекарственное средство на ПЭГ группу, либо 2 или больше лекарственных средств на ПЭГ группу. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает конъюгаты лиганд-лекарственное средство, содержащие по меньшей мере одно лекарственное средство на ПЭГ группу, и их промежуточные соединения.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что при условии присутствия основных компонентов конъюгатов лиганд-лекарственное средство (т.е. группа лиганда, расширяющая группа, параллельное соединительное звено, ПЭГ группа, высвобождаемая комплексная группа и группа лекарственного средства), синтез конъюгатов лиганд-лекарственное средство, включающих дополнительные группы лекарственного средства, можно легко осуществить с использованием раскрытия, представленного в настоящей заявке. Включение дополнительных разветвляющихся групп и/или групп присоединения лекарственного средства обеспечивают возможность присоединения нескольких групп лекарственного средства на ПЭГ группу. Дополнительные $-X-D$ группы присоединяют через разветвляющиеся группы или группы присоединения лекарственного средства.

В одной группе вариантов осуществления такие LDC соединения, способные высвободить свободное лекарственное средство, представлены формулами (I), (II) или (III):



; или



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

L представляет собой группу лиганда;

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z представляет собой расширяющую группу;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

AD представляет собой группу присоединения лекарственного средства;

индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12);

индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8 и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3;

индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2; и

индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

В другой группе вариантов осуществления формулы I, II и III представляют не индивидуальные LDC соединения, а LDC композицию (т.е. композицию, включающую популяцию индивидуальных LDC соединений). В таких вариантах осуществления, p представляет собой среднее количество лекарственное средство-линкер групп на Лиганд в композиции. В таких вариантах осуществления, p типично не является целочисленным значением и может находиться в пределах от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12). Другие переменные (например, L, Z, A, L^P, PEG, X, D, AD, s, m и t) имеют определенное выше значение.

В другой группе вариантов осуществления, LDC композиция включает популяцию LDC соединений, при этом индивидуальные LDC соединения представлены формулой I, II или III, где, для каждого индивидуального LDC соединения, p независимо выбран из целого числа, имеющего значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до около 12), и среднее количество лекарственное средство-линкер групп на лиганд в композиции составляет от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12).

В некоторых аспектах, от 1 до 32 или от 2 до 32 (предпочтительно от 6 до 32 или от 8 до 32) групп лекарственного средства присоединены к каждой группе лиганда. Популяция конъюгатов лиганд-лекарственное средство может содержать в среднем от 1 до 32, или примерно от 2 до 32 (предпочтитель-

но примерно от 6 до 32, или примерно от 8 до 32) групп лекарственного средства на лиганд.

Отдельные варианты осуществления формул I, II и III включают такие, в которых:

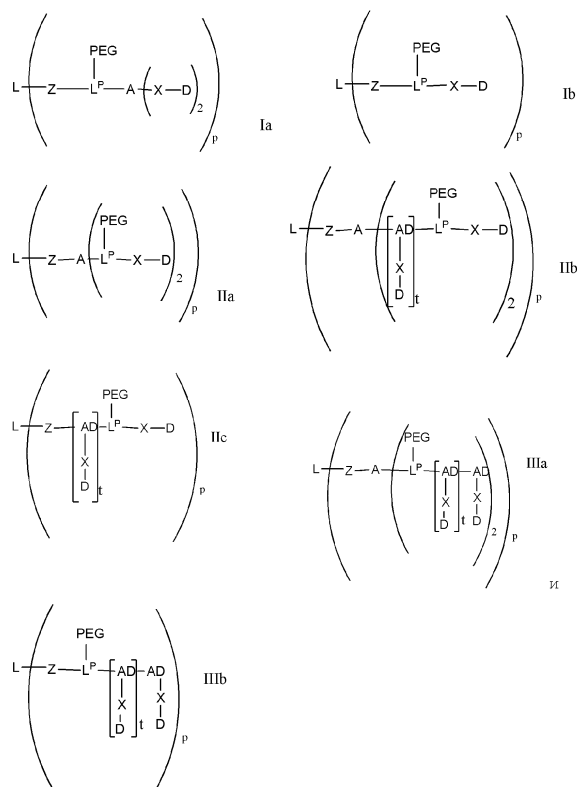
- 1) m имеет значение 1, и s имеет значение 0;
- 2) m имеет значение 2, 3 или 4 и s имеет значение 1;
- 3) m имеет значение 2 и s имеет значение 1;
- 4) m имеет значение 1; s имеет значение 0; и r представляет собой целое число, имеющее значение от 2 до 12, от 4 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12, для соединения-конъюгата лиганд-лекарственное средство, или r представляет собой число, имеющее значение от около 2 до около 12, от около 4 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12, для композиции конъюгатов лиганд-лекарственное средство;
- 5) m имеет значение 2, 3 или 4; s имеет значение 1; и r представляет собой целое число, имеющее значение от около 2 до около 12, от около 4 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12 для соединения-конъюгата лиганд-лекарственное средство, или r представляет собой число, имеющее значение от около 2 до около 12, от около 4 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12, для композиции конъюгатов лиганд-лекарственное средство;
- 6) m имеет значение 2; s имеет значение 1 и r представляет собой целое число, имеющее значение от 2 до 12, от 4 до 12, от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от около 8 до около 12 для соединения-конъюгата Лиганд-Лекарственное Средство, или r представляет собой число, имеющее значение от около 2 до около 12, от около 4 до около 12, от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12 для композиции конъюгатов лиганд-лекарственное средство;
- 7) m имеет значение 2; s имеет значение 1; и r имеет значение 8;
- 8) m имеет значение 1; s имеет значение 0; и r имеет значение 8;
- 9) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 0;
- 10) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 1-8;
- 11) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 1;
- 12) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 2;
- 13) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 3;
- 14) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 4;
- 15) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 5;
- 16) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 6;
- 17) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 7;
- 18) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-8 этого подраздела, где t имеет значение 8;
- 19) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-18 этого подраздела, где от 1 до 32 или примерно от 2 до 32 групп лекарственного средства присоединены к группе лиганда;
- 20) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-18 этого подраздела, где от 6 до 32 или примерно от 8 до 32 групп лекарственного средства присоединены к группе лиганда; и
- 21) любой из вариантов осуществления, описанных в пп.1-20 этого подраздела, где L^P представляет собой природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид или полиамин.

В любом из выбранных вариантов осуществления для LDC соединений, представленных в настоящей заявке, где r значение присутствует, включая варианты осуществления, описанные выше, r может представлять собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, от 2 до 14, от 2 до 10, от 4 до 12, от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 10. Индекс r может иметь значение 1 или 2 или 3 или 4 или 5 или 6 или 7 или 8 или 9 или 10 или 11 или 12 или 13 или 14.

В любом из выбранных вариантов осуществления для LDC композиций, представленных в настоящей заявке, где r значение присутствует, включая варианты осуществления, описанные выше, r имеет значение от 1 до около 14, от около 2 до около 14, от около 2 до около 10, от около 4 до около 12, от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 12 или от около 8 до около 10. Индекс r может иметь значение 1 или около 1, или 2 или около 2, или 3 или около 3, или 4 или около 4, или 5 или около 5, или 6 или около 6, или 7 или около 7, или 8 или около 8, или 9 или около 9, или 10 или около 10, или 11 или около 11, или 12 или около 12, или 13 или около 13, или 14 или около 14. Другие переменные (например, L, Z, A, L^P, PEG, X, D, AD, s, m и t) имеют определенное выше значение.

Отдельные варианты осуществления формул I, II и III включают формулы Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa и

IIIb, представленные ниже.



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где,

L представляет собой группу лиганда;

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z представляет собой расширяющую группу;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу и

AD представляет собой группу присоединения лекарственного средства;

нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14, или от 8 до 12) для соединения-конъюгата лиганд-лекарственное средство, или нижний индекс p означает число, имеющее значение от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для композиции конъюгатов лиганд-лекарственное средство; и

нижний индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8; и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3.

Отдельные варианты осуществления формул Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa и IIIb включают такие, в которых:

- 1) t имеет значение 0;
- 2) t имеет значение от 1 до 8;
- 3) t имеет значение 1;
- 4) t имеет значение 2;
- 5) t имеет значение 3;
- 6) t имеет значение 4;
- 7) t имеет значение 5;
- 8) t имеет значение 7;
- 9) t имеет значение 8;

10) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-10 этого подраздела, где от 1 до 32, примерно от 2 до 32, от 6 до 32 или примерно от 8 до 32 групп лекарственного средства присоединены к Группе Лиганда; и

11) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-11 этого подраздела, где L^P представляет собой природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид или полиамин.

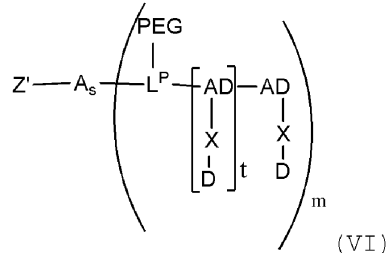
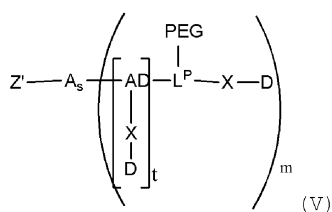
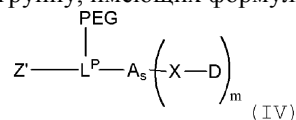
Варианты осуществления формул Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa и IIIb для LDC композиции включают

такие, в которых p представляет собой число, имеющее значение от 6 до около 12; от около 8 до около 12, и от около 8 до около 10. Для этих композиций нижний индекс p может иметь значение 6 или около 6, или 7 или около 7, или 8 или около 8, или 9 или около 9, или 10 или около 10, или 11 или около 11, или 12 или около 12, или 13 или около 13, или 14 или около 14. В любом из этих вариантов осуществления, t может иметь значение от 0 до 8, от 1 до 8, или 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Варианты осуществления формул Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa и IIIb для LDC соединения включают такие, в которых p представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 12; от 8 до 12 и от 8 до 10. Нижний индекс p может иметь значение 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14. В любом из этих вариантов осуществления, t может иметь значение от 0 до 8, от 1 до 8, или 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Соединения лекарственное средство-линкер

Ниже представлены примеры соединений лекарственное средство-линкер, содержащих по меньшей мере 1 лекарственное средство на ПЭГ группу, имеющих формулы IV, V, VI



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

D представляет собой группу лекарственного средства;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

A представляет собой необязательное разветвление;

AD представляет собой группу присоединения лекарственного средства;

нижний индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8; и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3;

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2;

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

Отдельные варианты осуществления формул IV, V и VI включают такие, в которых

1) m имеет значение 1, и s имеет значение 0;

2) m имеет значение от 2 до 4, и s имеет значение 1;

3) m имеет значение 2, и s имеет значение 1;

4) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-3 этого подраздела, где t имеет значение 0;

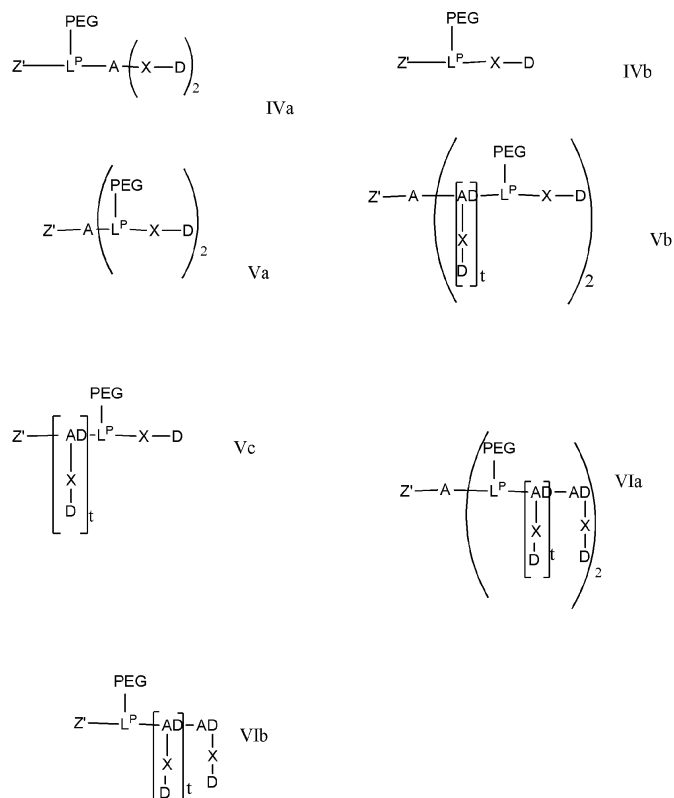
5) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-3 этого подраздела, где t имеет значение 1;

6) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-3 этого подраздела, где t имеет значение 2;

и

7) любой из вариантов осуществления, описанных в п.1-6 этого подраздела, где L^P представляет собой природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид или полиамин.

Отдельные варианты осуществления формул IV, V и VI включают следующие формулы:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где D представляет собой группу лекарственного средства; PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

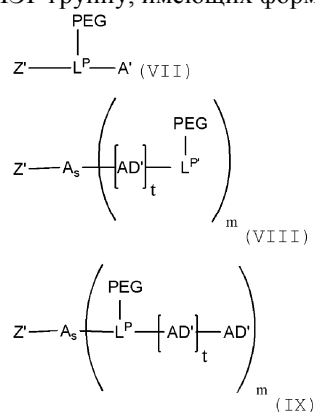
A представляет собой необязательное разветвление;

AD представляет собой группу присоединения лекарственного средства и

нижний индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8; и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3.

Промежуточные линкерные соединения

Ниже представлены примеры промежуточных линкерных соединений, включающих по меньшей мере одно лекарственное средство на ПЭГ группу, имеющих формулы VII, VIII или IX



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

A' представляет собой разветвляющуюся группу, способную образовывать ковалентное присоединение к двум-четырем X-D группам, предпочтительно к двум X-D группам;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

AD' представляет собой группу присоединения лекарственного средства, способную образовывать ковалентное присоединение к X-D группе;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D;

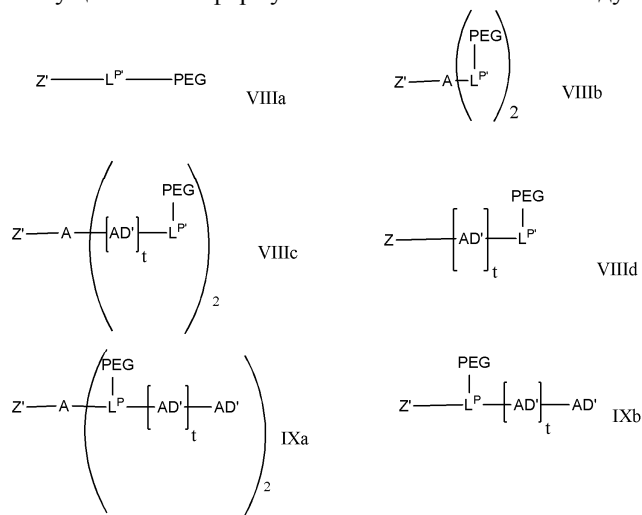
нижний индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8, и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3;

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2;

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4; и

где -X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства.

Отдельные варианты осуществления формул VIII или IX включают следующие:



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к группе лиганда;

A представляет собой разветвляющуюся группу;

AD' представляет собой группу присоединения лекарственного средства, способную образовывать ковалентное присоединение к -X-D группе;

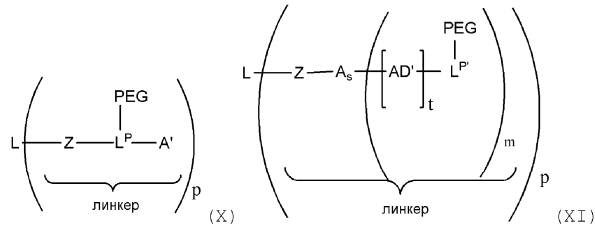
L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D; и

нижний индекс t представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 8; и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3; и

где -X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного Средства.

В промежуточных линкерных соединениях и формулах VII, VIII, XI, VIIIa, VIIIb, VIIIc, VIIId, IXa и IXb, расширяющая группа может быть конъюгирована с группой лиганда (например, антителом) с образованием промежуточных лиганд-линкер соединений, которые обеспечивают от 1 до 14 линкеров, присоединенных к каждой группе лиганда. Иллюстративные варианты осуществления показаны ниже, где p имеет значение от 1 до 14, и все другие переменные имеют значения, определенные в настоящей заявке для промежуточных линкерных соединений. Ниже представлены примеры лиганд-линкер соединений и композиций, включающих эти соединения (т.е. лиганд-линкер композиции), которые имеют структуры, представленные формулами X, XI, XII



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

L представляет собой группу лиганда;

PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;

Z- представляет собой расширяющую группу;

-X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства;

L^P представляет собой параллельное соединительное звено;

L^{P'} представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D;

A представляет собой разветвляющуюся группу, способную образовывать ковалентное присоединение к двум-четырем X-D группам, предпочтительно к двум X-D группам;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу;

AD' представляет собой группу присоединения лекарственного средства, способную образовывать ковалентное присоединение к X-D группе;

нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для лиганд-линкер соединения, или

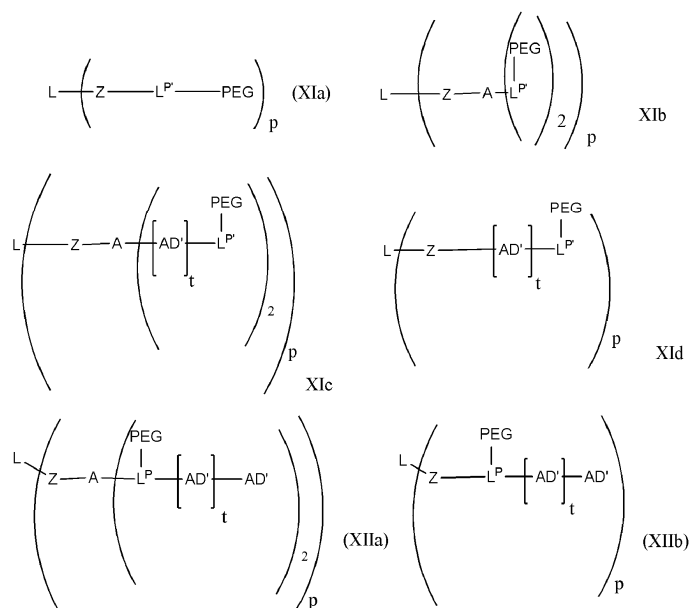
нижний индекс p означает число, имеющее значение от 1 до около 14, предпочтительно около 2 до около 12 (предпочтительно около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для лиганд-линкер композиции;

нижний индекс t имеет значение от 0 до 8; и предпочтительно имеет значение 0, 1, 2 или 3;

нижний индекс m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4; и предпочтительно имеет значение 1 или 2; и

нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что, когда s имеет значение 0, m имеет значение 1, и когда s имеет значение 1, m имеет значение 2, 3 или 4.

Отдельные варианты осуществления формул XI и XII включают следующие формулы.



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения где

- L представляет собой группу лиганда;
- PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля;
- Z- представляет собой расширяющую группу;
- L^P представляет собой параллельное соединительное звено;
- L^P представляет собой параллельное соединительное звено, способное образовывать ковалентное присоединение к -X-D;
- A представляет собой разветвляющуюся группу;
- AD' представляет собой группу присоединения лекарственного средства способен образовывать ковалентное присоединение к X-D группе;
- нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12 (предпочтительно от 6 до 14, от 6 до 12, от 8 до 14 или от 8 до 12) для лиганд-линкер соединения, или
- нижний индекс p означает число, имеющее значение от 1 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 12 (предпочтительно от около 6 до около 14, от около 6 до около 12,
- от около 8 до около 14 или от около 8 до около 12) для лиганд-линкер композиции; и
- нижний индекс t имеет значение от 0 до 8; и
- где -X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства.

Составляющие группы

Общим для конъюгатов лиганд-лекарственное средство и промежуточных соединений, описанных в настоящей заявке, является размещение ПЭГ группы в параллельной ориентации с ее группой лекарственного средства для влияния на фармакокинетику получаемого LDC. Размещение ПЭГ группы осуществляют при помощи параллельного соединительного звена. Параллельное соединительное звено служит для соединения лиганда с группой полиэтиленгликоля и группой лекарственного средства таким образом, чтобы группы ПЭГ и лекарственного средства находились в параллельной конфигурации, что обеспечивает расположение групп лиганда, ПЭГ и лекарственного средства в разветвленной конфигурации.

Соответственно, параллельное соединительное звено можно считать каркасом, содержащим участки присоединения для компонентов конъюгатов лиганд-лекарственное средство и промежуточных соединений для их получения.

Чтобы действовать как параллельное соединительное звено, L^P звено присоединяют через три участка присоединения в линкере. Один из участков присоединения присоединяет L^P звено к ПЭГ Группе. Второй участок присоединения присоединяет L^P звено к высвобождаемой комплексной группе (в некоторых случаях через разветвляющуюся группу A или группу присоединения лекарственного средства AD). Третий участок присоединения присоединяет L^P звено к расширяющей группе (в некоторых случаях через группу присоединения лекарственного средства AD и/или разветвляющуюся группу A). Параллельное соединительное звено представляет собой звено, которое является отличным от ПЭГ группы и присоединяется к ней через компонент присоединения ПЭГ в группе ПЭГ. То есть, параллельное соединительное звено не является субъединицей ПЭГ группы.

Что касается конъюгатов лиганд-лекарственное средство и их промежуточных соединений, содержащих больше чем одно лекарственное средство на ПЭГ группу, присоединение параллельного соединительного звена к высвобождаемой комплексной группе может происходить через разветвляющуюся

группу или группу присоединения лекарственного средства. Присоединение параллельного соединительного звена к расширяющей группе может происходить через группу присоединения лекарственного средства AD и/или необязательно через дополнительную разветвляющуюся группу. Во всех этих вариантах осуществления L^P звено можно рассматривать как три-функциональную химическую группу, которая способна ковалентно связывать вместе три отстоящие друг от друга химические группы. Как должно быть понятно, для отдельных промежуточных соединений L^P звено представлено как L^P и еще не присоединено к лекарственному средству через группу, высвобождающую лекарственное средство, но содержит необязательно защищенную функциональную группу для присоединения к лекарственному средству (например, через группу, высвобождающую лекарственное средство.) Также должно быть понятно, что термин "трифункциональный" используют для указания трех участков присоединения, а не количества функциональных групп, присутствующих в L^P или L^P звене.

Параллельное соединительное звено можно получить из одной или нескольких (типично от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или 1 или 2) природных или имеющих не-природное происхождение аминокислот, аминокспиртов, аминоальдегидов или полиаминов.

Должно быть понятно, что при ссылке на природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту, аминокспирт, аминоальдегид или полиамины, присутствующие в конъюгате или промежуточных соединениях по настоящему изобретению (независимо от того, являются ли они частью L^P Звена или другого компонента конъюгатов или промежуточных соединений, описанных в настоящей заявке), аминокислота, аминокспирт, аминоальдегид или полиамины существуют в остаточной форме, также указанной в настоящей заявке как объединенная форма. Например, в вариантах осуществления, где параллельное соединительное звено представляет собой две аминокислоты, эти две аминокислоты будут существовать в виде остатков с пептидной связью между ними. В вариантах осуществления, где параллельное соединительное звено состоит из аминокспирта, этот аминокспирт будет существовать в виде остатка, где, например, его аминогруппа связана с другим остатком параллельного соединительного звена или другим компонентом конъюгата через карбонил-содержащую функциональную группу такого другого остатка/компонента, при этом его гидроксильная группа связана в виде простого эфира с, или связана через карбонилсодержащую функциональную группу, с еще одним остатком параллельного соединительного звена или другим компонентом конъюгата. В вариантах осуществления, где параллельное соединительное звено состоит из аминоальдегида, этот аминоальдегид будет существовать в виде остатка, где, например, его амино группа связана с другим остатком параллельного соединительного звена или другим компонентом конъюгата через карбонилсодержащую функциональную группу такого другого остатка/компонента, при этом его альдегидная функциональная группа преобразуется в иминофункциональную группу, или через последующее восстановление с обеспечением азот-углеродной связи при связывании с амино группой еще одного остатка параллельного соединительного звена или другого компонента конъюгата. Аминокспирт или аминоальдегид могут быть образованы из природной или не встречающейся в природе аминокислоты путем восстановления ее карбоновокислотной функциональной группы до альдегида или гидроксильной функциональной группы.

Когда остаток параллельного соединительного звена представляет собой разветвляющийся остаток для этого звена, должно быть понятно, что остаток будет содержать третью функциональную группу, с которой связывается другой остаток параллельного соединительного звена, -X-D группа или ПЭГ группа или другой компонент линкерной группы. Например, аминокислота или другой аминсодержащий кислотный остаток параллельного соединительного звена может содержать или может быть замещен функционализированной боковой цепью для обеспечения необходимых трех точек присоединения, требуемых для разветвляющегося остатка. Например, серин содержит три функциональные группы, т.е. кислотную, амино и гидроксильную функциональные группы, и может рассматриваться как объединенный аминокислотный и аминокспиртовой остаток для целей его включения в параллельное соединительное звено. Тирозин также содержит гидроксильную группу, в этом случае в его фенольной боковой цепи, и также может рассматриваться аналогично серину для целей его включения в качестве разветвляющегося остатка в параллельное соединительное звено.

В другом примере, когда разветвляющийся остаток параллельного соединительного звена представляет собой цистеин, его амино и карбоновокислотная группа будут существовать в остаточной форме, также как обсуждалось выше для аминокислот или аминсодержащих кислот, для обеспечения двух из трех необходимых точек присоединения для разветвляющегося остатка, в то время как его тиольная группа будет существовать в остаточной форме, когда она связана с -X-D группой или ПЭГ Группой или другим компонентом линкерной группы в виде дисульфида, или в виде сера-углеродной связи, например, когда тиольная функциональная группа взаимодействует с малеимид-содержащей группой компонента Линкерной Группы. В некоторых случаях, остаточная группа тиола находится в его окисленной форме (т.е. -S(=O)- или -S(=O)₂-), когда она связана с другим остатком параллельного соединительного звена или с другим компонентом линкерной группы. Еще в одном примере, альфа аминок и карбоновокислотная группа лизина будут существовать в остаточной форме для обеспечения двух из трех необходимых точек присоединения, требуемых для разветвляющегося остатка параллельного соединительного звена, тогда как его эпсилон-аминогруппа в ее остаточной форме обеспечивает третью точку присоединения. Гисти-

дин также может рассматриваться в качестве аминокислоты с двумя амино группами, где вторая амино группа представляет собой NH имидазол-содержащей боковой цепи.

В другом примере, когда разветвляющийся остаток параллельного соединительного звена представляет собой аспарагиновую или глутаминовую кислоту, альфа амино и С-концевая карбоновокислотная группы аминокислоты в их остаточных формах обеспечивают две из трех необходимых точек присоединения, требуемых для разветвляющегося остатка параллельного соединительного звена, в то время как его бета или гамма карбоновокислотная группа в ее остаточной форме обеспечивает третью точку присоединения. В тех случаях, когда аминокислота природного происхождения описана как остаток параллельного соединительного звена, но по своей природе не содержит функционализированную аминокислотную боковую цепь, но при этом требуется, чтобы она была разветвляющимся остатком, должно быть понятно, что структуру аминокислоты модифицируют, чтобы она содержала дополнительную функциональную группу помимо ее амино и карбоновокислотной функциональных групп, когда она находится в остаточной форме, для обеспечения необходимой третьей точки присоединения. Например, аминокислота, содержащая алифатическую боковую цепь, может быть замещена по углероду этой боковой цепи гидроксильной, амино, альдегидной, тиольной, карбоновокислотной группой или другой функциональной группой или другой группой (например, арилом или арилалкилом), замещенной любой из этих функциональных групп, с получением не встречающейся в природе аминокислоты, содержащей необходимые три точки присоединения. Такие не встречающиеся в природе аминокислоты встраивают в параллельное соединительное звено, как описано выше для аминокислот и остаточных форм введенных функциональных групп.

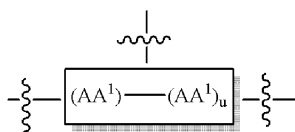
Подобным образом, когда аминокальдегид или аминоспирт встраивают в параллельное соединительное звено в качестве разветвляющегося остатка, этот аминокальдегид или аминоспирт будет содержать третью функциональную группу для обеспечения, наряду с его амино и альдегидной функциональными группами, необходимых трех точек присоединения. В этих случаях аминокальдегид или аминоспирт могут соответствовать по структуре природной аминокислоте, которая содержит функционализированную боковую цепь, или не встречающейся в природе аминокислоте, содержащей функциональную группу, которая была введена в боковую цепь природной аминокислоты, как описано выше, в которой карбоновую кислоту природной или не встречающейся в природе аминокислоты восстанавливают до гидроксид или альдегидной функциональной группы.

Аминокислота может представлять собой альфа, бета или гамма аминокислоту или другое аминокислотное соединение и может присутствовать в виде ее D или L изомера, если содержит хиральный углерод, с которым связана боковая цепь природной или не встречающейся в природе аминокислоты. Когда параллельное соединительное звено состоит из больше чем одной природной или не встречающейся в природе аминокислоты, аминоспирта, аминокальдегида или полиаминов, эти аминокислоты, аминоспирты, аминокальдегиды, полиамины или их комбинации связаны вместе через ковалентные связи с образованием параллельного соединительного звена.

Аминокислота, аминоспирт или аминокальдегид могут быть не природного происхождения и могут быть модифицированы, чтобы иметь функционализированную боковую цепь для присоединения к компонентам конъюгатов или промежуточных соединений (как описано выше для разветвляющегося остатка параллельного соединительного звена), в зависимости от ситуации. Примеры функционализированных аминокислот, аминоспиртов или аминокальдегидов включают, например, азидо или алкин функционализированные аминокислоты, аминоспирты или аминокальдегиды (например, аминокислота, аминоспирт или аминокальдегид, модифицированные так, чтобы они содержали группу азидо или группу алкина для присоединения с использованием клик-химии). Способы независимой активации и взаимодействия функциональных групп, присутствующих в аминокислоте - например, аминовой части, карбоновокислотной части и боковой цепи (будь то, например, амино группа, гидроксильная группа, другая карбоновая кислота, тиол, азид или алкин), хорошо известны в данной области.

Параллельное соединительное звено может включать 1 или больше (типично от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или 1 или 2) аминокислот, необязательно замещенных C₁₋₂₀ гетероалкиленов (предпочтительно необязательно замещенный C₁₋₁₂ гетероалкилен), необязательно замещенных C₃₋₈ гетероцикло, необязательно замещенных C₆₋₁₄ ариленов, необязательно замещенных C₃₋₈ карбоцикло или их комбинации. В некоторых аспектах, Параллельное Соединительное Звено включает не больше чем 2 или не больше чем один необязательно замещенный C₁₋₂₀ гетероалкилен, необязательно замещенный C₃₋₈ гетероцикло, необязательно замещенный C₆₋₁₄ арилен или необязательно замещенный C₃₋₈ карбоцикло. Необязательные заместители включают (=O), -X, -R, -OR, -SR, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂ или -C(=NR)NR₂, где каждый X независимо представляет собой галоген: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R независимо представляет собой -H, -C₁ C₂₀алкил, -C₆ C₂₀арил, -C₃ C₁₄гетероцикл, защитную группу или пролекарственную группу. Предпочтительные необязательные заместители представляют собой (=O), -X, -R, -OR, -SR и -NR₂.

Параллельное соединительное звено может представлять собой линейную или разветвленную цепь и может быть представлено формулой А



Формула А,

где

AA^1 представляет собой субъединицу L^P , независимо выбранную из аминокислоты, обязательно замещенного C_{1-20} гетероалкилена (предпочтительно обязательно замещенного C_{1-12} гетероалкилена), обязательно замещенного C_{3-8} гетероцикло, обязательно замещенного C_{6-14} арилена или обязательно замещенного C_{3-8} карбоцикло;

и нижний индекс и независимо выбран из значений от 0 до 4; и волнистая линия указывает участки ковалентного присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточном соединении. Обязательно замещенные гетероалкилен, гетероцикл, арилен или карбоцикло должны содержать функциональные группы для присоединений между субъединицами и в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях.

В некоторых аспектах по меньшей мере в одном случае AA^1 представляет собой аминокислоту. Нижний индекс и может иметь значение 0, 1, 2, 3 или 4. В некоторых аспектах, AA^1 представляет собой аминокислоту, и имеет значение 0. В некоторых аспектах параллельное соединительное звено включает не больше чем 2 обязательно замещенных C_{1-20} гетероалкиленов, обязательно замещенных C_{3-8} гетероцикло, обязательно замещенных C_{6-14} ариленов или обязательно замещенных C_{3-8} карбоцикло. В некоторых аспектах, когда параллельное соединительное звено имеет формулу А, параллельное соединительное звено включает не больше чем 1 обязательно замещенный C_{1-20} гетероалкилен, обязательно замещенный C_{3-8} гетероцикло, обязательно замещенный C_{6-14} арилен или обязательно замещенный C_{3-8} карбоцикло.

Параллельное соединительное звено или его аминокислотная субъединица может представлять собой альфа, бета или гамма аминокислоту, которая может быть природного или не-природного происхождения. Аминокислота может представлять собой D или L изомер. Присоединение в параллельном соединительном звене или с другими компонентами конъюгата (или линкера) можно осуществлять, например, через amino, карбокси или другие функциональные группы. Способы независимой активации и взаимодействия функциональных групп хорошо известны в данной области.

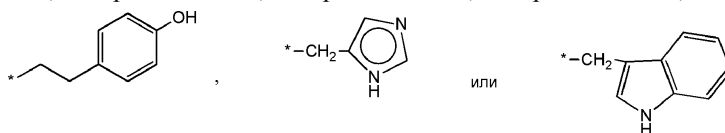
Параллельное соединительное звено или его аминокислотная субъединица могут быть независимо выбраны из D или L изомера тиол-содержащей аминокислоты. Тиолсодержащая аминокислота может представлять собой, например, цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

Параллельное соединительное звено или его аминокислотная субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из L- или D-изомеров следующих аминокислот: аланин (включая β -аланин), аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, цистеин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин фенилаланин, лизин, лейцин, метионин, серин, тирозин, треонин, триптофан, пролин, орнитин, пеницилламин, В-аланин, аминоалкиновая кислота, аминоалкандиовая кислота, гетероцикло-карбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминоалкановая кислота и их производные.

Предпочтительные аминокислоты включают цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислот, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин и аланин.

Примеры L^P или его AA^1 субъединиц включают

-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-,



где звездочка указывает присоединение к углероду, помеченному символом x;

R¹⁰⁰ независимо выбран из водорода или -C₁-C₃ алкила (предпочтительно из водорода или CH₃),

R¹³ независимо выбран из группы, состоящей из следующих: -C₁-C₆ алкилен-, -C₃-C₈карбоцикло-, -арилен-, -C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈гетероцикло-, -C₁-C₁₀алкилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈карбоцикло)-, -(C₃-C₈карбоцикло) -C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈гетероцикло)- и -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен- (предпочтительно -CH₂-CH₂-);

Y представляет собой -



или -

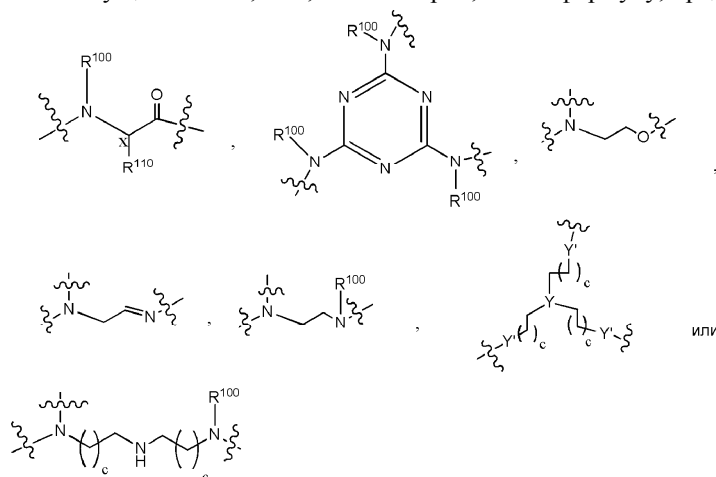


Y' представляет собой -C(=O)-, -O-, -S-, -NH- или -N(CH₃)- и

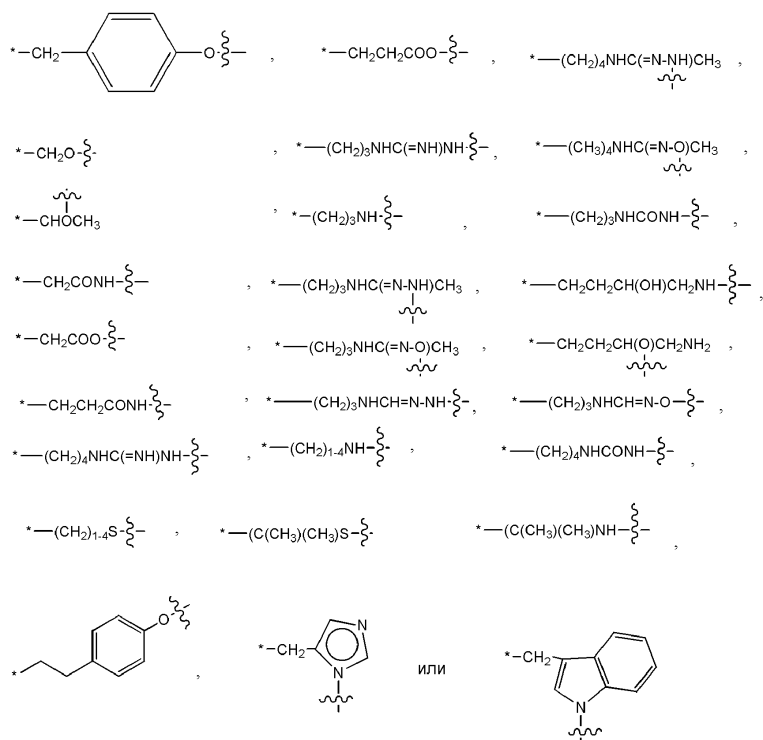
нижние индексы p, q и d представляют собой целые числа, независимо выбранные из значений 0-5; и волнистая линия указывает ковалентное присоединение в соединении, водород, OH или C₁₋₃ незамещенную алкильную группу, при условии, что по меньшей мере одна из волнистых линий указывает ковалентное присоединение в соединении. В некоторых аспектах, все волнистые линии указывают ковалентное присоединение в соединении (например, когда L^p не включает никакие субъединицы).

В одной группе вариантов осуществления, L^p представляет собой гетероциклическое кольцо, содержащее функциональные группы, которые могут независимо образовывать ковалентные связи с указанными компонентами (например, триазольное гетероциклическое кольцо, образованное из хлорангидрида циануровой кислоты). В другой группе вариантов осуществления, L^p представляет собой алкан, содержащий присоединенные функциональные группы, как указано выше. В некоторых других вариантах осуществления, L^p может представлять собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления, -L^p-, после сборки, имеет формулу, представленную ниже



где волнистая линия указывает участки присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточном соединении (например, ПЭГ к -X (непосредственно или опосредованно через A или AD) и к Z (непосредственно или опосредованно через A или AD), и где R¹¹⁰ представляет собой



где звездочка указывает присоединение к углероду, помеченному символом x , и волнистая линия указывает один из трех участков присоединения;

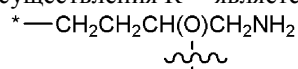
R^{100} независимо выбран из водорода или $-C_1-C_3$ алкила, предпочтительно из водорода или CH_3 ,

Y независимо выбран из N или CH ,

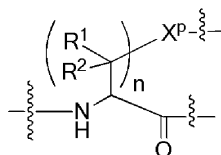
Y^1 независимо выбран из NH , O или S и

нижний индекс s представляет собой целое число, независимо выбранное из 1-10, и предпочтительно 1, 2 или 3.

В предпочтительных вариантах осуществления R^{110} является отличным от



Параллельное соединительное звено или его аминокислотная субъединица могут иметь формулу, представленную ниже



где нижний индекс p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4;

X^p выбран из группы, состоящей из $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(=O)-$, $-C(=O)-$ или $-C_2-C_8$ гетероцикло-; и

R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из $-H$, $-C_{1-3}$ алкила, $-$ фенила или $-C_2-C_5$ гетероцикла (предпочтительно H или C_{1-3} алкила), где волнистая линия указывает ковалентное присоединение в соединении.

В некоторых вариантах осуществления X^p обеспечивается боковой цепью природной или не встречающейся в природе аминокислоты.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из D или L изомера лизина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, цистеина, пеницилламина, серина или треонина.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из D или L изомера лизина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, цистеины или пеницилламина.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из следующих аминокислот: аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин, лизин, серин, тирозин, треонин, триптофан, орнитин, пеницилламин, аминоканониновая кислота, аминоканонидиновая кислота, гетероцикло-карбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминоалкановая кислота и их производные.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны

из группы, состоящей из следующих L-изомеров этих природных аминокислот: аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин, лизин, цистеин, пеницилламин, серин, тирозин, треонин и триптофан.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из следующих D-изомеров этих природных аминокислот: аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, цистеин, пеницилламин серин, тирозин, треонин, и триптофан.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из D или L изомера тиолсодержащей аминокислоты. Тиолсодержащая аминокислота может представлять собой, например цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из L- или D-изомеров следующих аминокислот: аланин (включая β-аланин), аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, цистеин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин фенилаланин, лизин, лейцин, метионин, серин, тирозин, треонин, триптофан, пролин, орнитин, пеницилламин, В-аланин, аминокислотная кислота, аминокислотная кислота, гетероцикло-карбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминоалкановая кислота и их производные.

Предпочтительные аминокислоты включают цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин и валин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных аланина, при условии, что присутствует подходящее количество функциональных единиц. Иллюстративные примеры производных аланина включают, но не ограничиваются этим: дегидро-аланин, 4-тиазолилаланин, 2-пиридилаланин, 3-пиридилаланин, 4-пиридилаланин, β-(1-нафтил)аланин, β-(2-нафтил)аланин, α-аминомасляная кислота, β-хлораланин, β-цианоаланин, β-циклопентил-аланин, β-циклогексил-аланин, β-иод-аланин, β-циклопентенил-аланин, β-tBu-аланин, β-циклопропил-аланин, β-дифенил-аланин, β-фтор-аланин, β-пиперазинил-аланин, где пиперазиновое кольцо является защищенным или незащищенным, β-(2-хинолил)аланин, β-(1,2,4-триазол-1-ил)аланин, β-уреидоаланин, N-β-(3-бензотиенил)-Ala-OH и N-β-(2-тиенил)-Ala-OH.

Каждое Параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аргинина и производных аргинина. Иллюстративные примеры аргинина и его производных включают, но не ограничиваются этим: аргинин (Arg), N-алкил-аргинин, N-Arg(Me)-OH, N-Arg(NH₂)-OH, N-Arg(NO₂)-OH, N-Arg(Ac)₂-OH, N-Arg(Me)₂-OH (асимметричный), N-Arg(Me)₂-OH (симметричный), 2-амино-4-(2'-гидроксигуанидино)-масляная кислота (N-ω-гидрокси-нор-аргинин) и гомоаргинин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры аспарагиновой кислоты и ее производных включают, но не ограничиваются этим: аспарагиновую кислоту (Asp), N-алкил-аспарагиновую кислоту и N-Asp(OtBu)-OH.

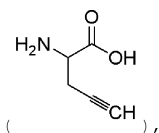
Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аспарагина и его производных. Иллюстративные примеры аспарагина и его производных включают, но не ограничиваются этим: аспарагин (Asn), N-алкил-аспарагин и изоаспарагин (H-Asp-NH₂).

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из цистеина и его производных. Иллюстративные примеры цистеина (Cys) и его производных (не содержащих свободную SH группу) включают, но не ограничиваются этим: Cys(StBu), H-Cys(Acm)-OH, H-Cys(Trt)-OH, H-Cys(StBu)-OH, H-Cys(Bzl)-OH, H-Cys(S-Et)-OH, H-Cys(SO₃H)-OH, H-Cys(аминоэтил)-OH, H-Cys(карбамоил)-OH, H-Cys(S-фенил)-OH, H-Cys(Boc)-OH и H-Cys(гидроксиэтил)-OH.

Каждое Параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из гистидина и его производных. Иллюстративные примеры гистидина и его производных включают, но не ограничиваются этим: гистидин (His), N-алкил-гистидин, H-His(Boc)-OH, H-His(Bzl)-OH, H-His(1-Me)-OH, H-His(1-Tos)-OH, H-2,5-дидиод-His-OH и H-His(3-Me)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных глицина. Иллюстративные примеры производных глицина включают, но не ограничиваются этим:

N-пропаргилглицин



α-аминоглицин (защищенный или нет), β-циклопропилглицин, α-аллилглицин и неопентилглицин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из глутаминовой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры глутаминовой кислоты и ее производных включают, но не ограничиваются этим: глутаминовую кислоту (Glu), N-алкил-глутаминовую кислоту, H-Glu(OtBu)-OH, H- γ -гидрокси-Glu-OH, H- γ -метилен-Glu-OH, H- γ -карбоксо-Glu(OtBu)₂-OH и пироглутаминовую кислоту.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из глутамина и его производных. Иллюстративные примеры глутамина и его производных включают, но не ограничиваются этим: глутамин (Gln), N-алкил-глутамин, изоглутамин (H-Glu-NH₂), H-Gln(Trt)-OH и H-Gln(изопропил)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных фенилаланина (Phe). Иллюстративные примеры производных фенилаланина включают, но не ограничиваются этим: H-п-амино-Phe-OH, H-п-амино-Phe(Z)-OH, H-п-бром-Phe-OH, HH-п-карбоксо-Phe(OtBu)-OH, H-п-карбоксо-Phe-OH, H-п-циано-Phe-OH, H-п-фтор-Phe-OH, H-3,4-дихлор-Phe-OH, H-п-иод-Phe-OH, H-п-нитро-Phe-OH, хлор-фенилаланин и β -гомофенилаланин.

Каждое параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из лизина и его производных. Иллюстративные примеры лизина и его производных включают, но не ограничиваются этим: лизин (Lys), N-алкил-лизин, H-Lys(Boc)-OH, H-Lys(Ac)-OH, H-Lys(Формил)-OH, H-Lys(Me)₂-OH, H-Lys(никотиноил)-OH, H-Lys(Me)₃-OH, H-транс-4,5-дегидро-Lys-OH, H-Lys(Alloc)-OH, H- H- δ -гидрокси-Lys-OH, H- δ -гидрокси-Lys(Boc)-OH, H-Lys(ацетидаоил)-OH и H-Lys(изопропил)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных лейцина. Иллюстративные примеры производных лейцина включают, но не ограничиваются этим, 4,5-дегидролейцин.

Каждое Параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных метионина. Иллюстративные примеры производных метионина включают, но не ограничиваются этим: метионин (Met), H-Met(=O)-OH и H-Met(=O)₂-OH, где атом серы боковой цепи метионина находится в окисленной форме.

Каждое Параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из серина и его производных. Иллюстративные примеры серина и его производных включают, но не ограничиваются этим: серин (Ser), N-алкил-серин, H-Ser(Ac)-OH, H-Ser(tBu)-OH, H-Ser(Bzl)-OH, H-Ser(п-хлор-Bzl)-OH, H- β -(3,4-дигидроксифенил)-Ser-OH, H- β -(2-тиенил)-Ser-OH, изо-серин N-алкил-изосерин и 3-фенилизосерин.

Каждое Параллельное Соединительное Звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из тирозина и его производных. Иллюстративные примеры тирозина и его производных включают, но не ограничиваются этим: тирозин (Tyr), N-алкил-тирозин, H-3, 5-динитро-Tyr-OH, H-3-амино-Tyr-OH, H-3,5-дибром-Tyr-OH, H-3,5-дииод-Tyr-OH, H-Tyr(Me)-OH, H-Tyr(tBu)-OH, H-Tyr(Boc)-OH, H-Tyr(Bzl)-OH, H-Tyr(Et)-OH, H-3-иод-Tyr-OH и H-3-нитро-Tyr-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из треонина и его производных. Иллюстративные примеры треонина и его производных включают, но не ограничиваются этим: треонин (Thr), N-алкил-треонин, allo-треонин, H-Thr(Ac)-OH, H-Thr(tBu)-OH и H-Thr(Bzl)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из триптофана и его производных. Иллюстративные примеры триптофана и его производных включают, но не ограничиваются этим: триптофан (Trp), N-алкил-триптофан, H-5-Me-Trp-OH, H-5-гидрокси-Trp-OH, H-4-Me-Trp-OH, H- α -Me-Trp-OH, H-Trp(Boc)-OH, H-Trp(формил)-OH и H-Trp(мезитилен-2-сульфонил)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из пролина и его производных. Иллюстративные примеры пролина и его производных включают, но не ограничиваются этим: пролин (Pro), N-алкилпролин, гомопролин, тиопролин, гидроксипролин (H-Hyp-OH), H-Hyp(tBu)-OH, H-Hyp(Bzl)-OH, H-3,4-дегидро-Pro-OH, 4-кетопролин, α -Me-Pro-OH и H-4-фтор-Pro-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из орнитина и его производных. Иллюстративные примеры орнитина и его производных включают, но не ограничиваются этим: орнитин (Orn), N-алкил-орнитин, H-Orn(Boc)-OH, H-Orn(Z)-OH, H- α -дифтор-Me-Orn-OH (эфлорнитин) и H-Orn(Alloc)-OH.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из пеницилламина и его производных. Иллюстративные примеры пеницилламина и его производных включают, но не ограничиваются этим: пеницилламин, H-пеницилламин (Acм)-OH (H- β , β -диметилсуэ(Acм)-OH) и N-алкил-пеницилламин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны

из группы, состоящей из производных β -аланина. Иллюстративные примеры производных β -аланина включают, но не ограничиваются этим: дегидро-аланин.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из производных аминокановой кислоты. Иллюстративные примеры производных аминокановой кислоты включают, но не ограничиваются этим: 4-(неопентилоксисульфонил)аминомасляную кислоту, пиперидилуксусную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту и 3-амино-3-(3-пиридил)пропионовую кислоту.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аминокановой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры аминокановой кислоты и ее производных включают, но не ограничиваются этим N-алкиламиноалкиновую кислоту, 6-амино-4-гексиновую кислоту, 6-(Вос-амино)-4-гексиновую кислоту.

Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аминокандиовой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры аминокандиовой кислоты и ее производных включают, но не ограничиваются этим N-алкиламиноалкиндиовую кислоту, 2-аминогександиовую кислоту, 2-аминогептандиовую кислоту, 2-аминооктандиовую кислоту (H-Asu-OH).

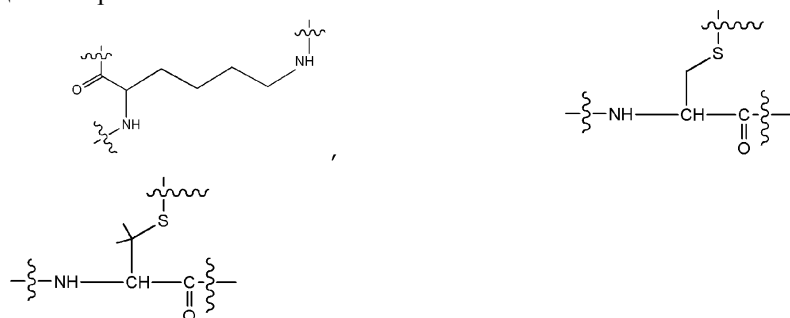
Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из аминок-гетероцикло-алкановой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры аминок-гетероциклоалкановой кислоты и ее производных включают, но не ограничиваются этим: N-алкиламиногетероциклоалкановые кислоты, 4-амино-1-метил-1H-имидазол-2-карбоновую кислоту, 4-амино-1-метил-1H-пиррол-2-карбоновую кислоту, 4-аминопиперидин-4-карбоновую кислоту (H-Pip-OH; 1-защищенную или нет), 3-амино-3-(3-пиридил)пропионовую кислоту.

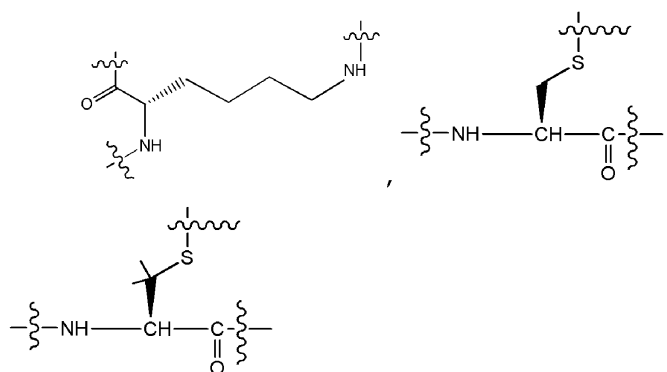
Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из цитруллина и его производных. Иллюстративные примеры цитруллина и его производных включают, но не ограничиваются этим: цитруллин (cit), N-алкилцитруллин, тиоцитруллин, S-метилтиоцитруллин и гомоцитруллин.

Иллюстративные примеры статина и его производных включают, но не ограничиваются этим: статин, N-алкил-статин, циклогексилстатин и фенилстатин.

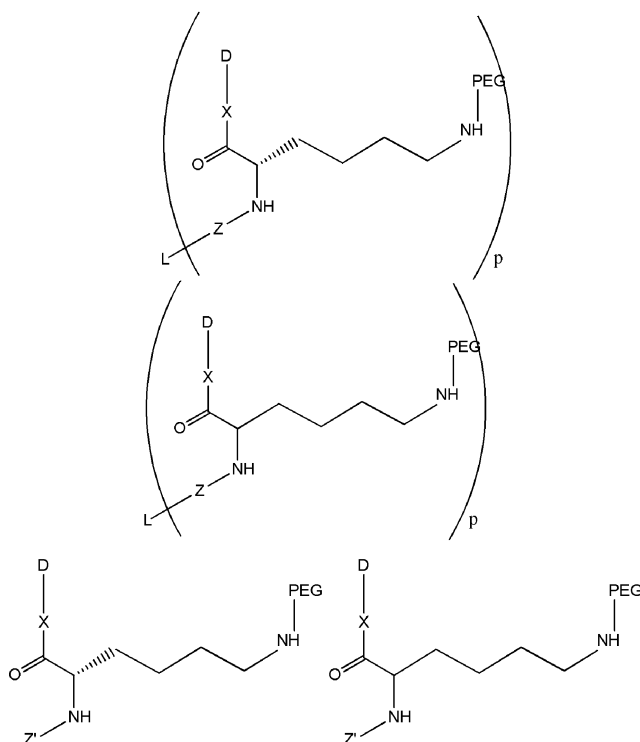
Каждое параллельное соединительное звено или его субъединица могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из диаминоалкановой кислоты и ее производных. Иллюстративные примеры диаминоалкановой кислоты (Dab) и ее производных включают, но не ограничиваются этим: N-алкил-диамино-алкановые кислоты, N,N-диалкиламиноалкановые кислоты, α,γ -диаминамасляную кислоту (H-Dab-OH), H-Dab(Alloc)-OH, H-Dab(Вос)-OH, H-Dab(Z)-OH, α,β -диаминопропионовую кислоту и ее варианты с защищенной боковой цепью.

Иллюстративное L^P звено или его субъединица, лизин или цистеин или пеницилламин, показаны ниже. Волнистая линия указывает участки присоединения к ПЭГ, высвобождаемой комплексной группе (непосредственно или через разветвляющуюся группу или группу присоединения лекарственного средства) и к расширяющей группе (непосредственно или через разветвляющуюся группу или группу присоединения лекарственного средства). L и D изомеры аминокислот являются подходящими для использования в настоящем изобретении.

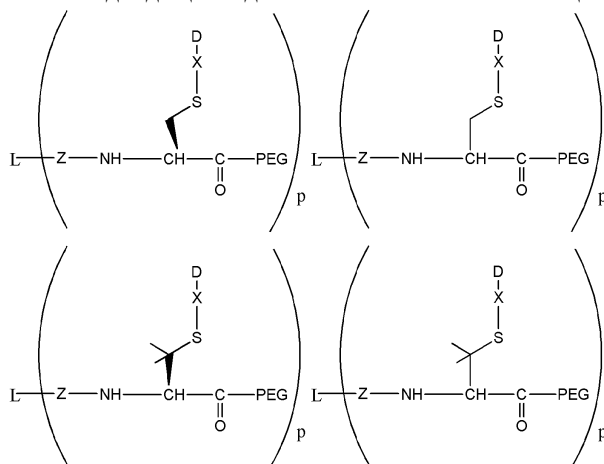




Пример конъюгата лиганд-лекарственное средство или лекарственное средство-линкер соединения, содержащего лизин в качестве L^P звена, показан ниже, где Z, L, X, D, ПЭГ, Z', p и ПЭГ имеют значение, определенное выше. L и D изомеры аминокислот являются подходящими для использования в настоящем изобретении.

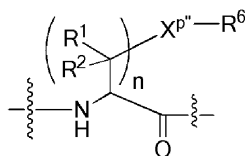


Пример конъюгата лиганд-лекарственное средство, содержащего цистеин или пеницилламин в качестве L^P звена, показан ниже, где Z, L, X, D, Z', ПЭГ и p имеют значение, определенное выше. L и D изомеры аминокислот являются подходящими для использования в настоящем изобретении.



Должно быть понятно, что для некоторых соединений по настоящему изобретению (например, промежуточных линкерных соединений и лиганд-линкер соединений), параллельное соединительное звено способно образовывать ковалентное присоединение к -X-D, но еще несвязано с -X-D, и параллель-

ное соединительное звено еще не будет полностью скомпоновано в конъюгат лиганд-лекарственное средство и, таким образом, будет включать функциональную группу, которая способна взаимодействовать с группой, присутствующей в высвобождаемой комплексной группе. Иллюстративное параллельное соединительное звено, содержащее функциональную группу для присоединения, представляет собой следующее:



где

нижний индекс n имеет значение от 1 до 4;

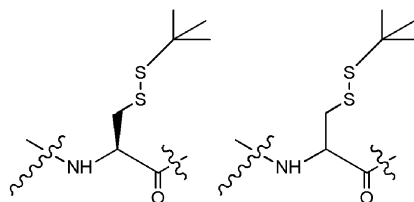
$X^{p''}$ выбран из группы, состоящей из $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-C(=O)-$ и $-S(=O)-$; и

R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-3} алкила, фенила или C_2-C_5 гетероцикла;

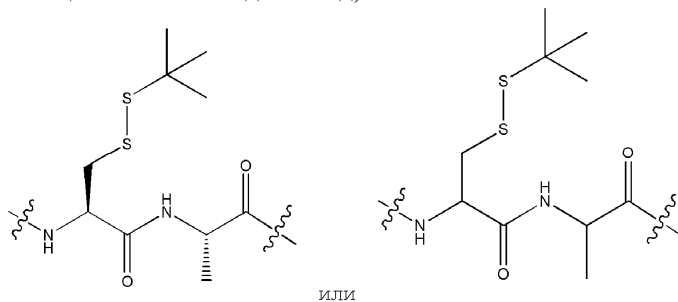
R^6 представляет собой защитную группу, H, $-C_{1-3}$ алкил или $-OH$,

где волнистые линии указывают ковалентное присоединение в остальной части промежуточного линкерного соединения или лиганд-линкер соединения.

Особенно предпочтительные реакционноспособные функциональные группы, которые обеспечивают $X^{p''}$, представляют собой сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей или тиоэфирных связей. Функциональная группа может быть защищена защитной группой. L^P может представлять собой тиол-содержащую группу (например, тиол-содержащую аминокислоту) и, таким образом, L^P может представлять собой защищенную тиолсодержащую аминокислоту, такую как защищенный цистеин, как показано ниже. Хотя ниже представлена формула L-изомера цистеина, D-изомер цистеина также является подходящим. Кроме того, трет-бутилтиольную защитную группу можно заменить другой подходящей защитной группой тиола. Тиолзащитные группы включают трет-бутилсульфид, н-бутилсульфид, н-пропилсульфид, метилсульфид, фенилсульфид, тиопиридил, изопропилсульфид, этилсульфид и цистеинил.



L^P может представлять собой дипептид, включающий защищенную тиол-содержащую аминокислоту, такой как защищенный цистеин-аланин дипептид, как показано ниже:



где волнистые линии указывают ковалентное присоединение L^P в остальной части линкерного промежуточного соединения

В предпочтительных вариантах осуществления, L^P звено выбирают таким образом, чтобы минимизировать или не способствовать увеличению гидрофобности лекарственное средство-линкер частей конъюгатов лиганд-лекарственное средство.

В предпочтительных аспектах настоящего изобретения, L^P группа имеет массу не больше чем около 500 дальтон, не больше чем около 200 дальтон, от около 10 до около 500 дальтон, или от около 10 до около 200 дальтон.

На концах конъюгатов лиганд-лекарственное средство присутствуют группы лиганда, группы лекарственного средства и ПЭГ группы.

Группы лиганда

В некоторых вариантах осуществления изобретения, присутствует группа лиганда. Группа лиганда (L-) представляет собой агент направленной доставки, который специфически связывается с молекулой-мишенью. Лиганд может специфическим образом связываться с компонентом клетки (связывающийся с клеткой агент) или с другими молекулами-мишенями, представляющими интерес. Группа лиганда действует как осуществляющая нацеливание и направленную доставку группы лекарственного средства к кон-

кретной популяцию клеток-мишеней, с которой группа лиганда взаимодействует. Лиганды включают, но не ограничиваются этим, белки, полипептиды и пептиды. Подходящие группы лиганда включают, например, антитела, например, полноразмерные антитела и их антиген-связывающие фрагменты, интерфероны, лимфокины, гормоны, факторы роста и колониестимулирующие факторы, витамины, транспортирующие питательные вещества молекулы (такие как, но не ограничиваясь этим, трансферрин) или любую другую связывающуюся с клеткой молекулу или вещество. Лиганд может представлять собой, например, отличный от антитела белок, осуществляющий направленную доставку. Альтернативно, лиганд может представлять собой, например, антитело. Предпочтительные лиганды представляют собой высокомолекулярные белки, например, лиганды, имеющие молекулярную массу по меньшей мере около 80 кДа.

Группа лиганда может образовывать связь с расширяющей группой. Группа лиганда должна содержать необходимое количество участков присоединения для лекарственного средства-линкера, независимо от того, имеют они природное или не-природное происхождение (например, сконструированные). Например, для того чтобы значение нижнего индекса p составляло от 6 до 14, Группа лиганда должна быть способна образовывать связь с от 6 до 14 группами лекарственного средства-линкер. Участки присоединения могут быть природного происхождения или сконструированными в лиганде. Группа лиганда может образовывать связь с расширяющей группой линкерной группы через реакционноспособный или активируемый гетероатом или гетероатом-содержащую функциональную группу лиганда. Реакционно-способные или активируемые гетероатомы или гетероатом-содержащая функциональная группа, которые могут присутствовать в группе лиганда, включают серу (в одном варианте осуществления, из сульфгидрильной группы лиганда), C=O или (в одном варианте осуществления, из карбонильной, карбоксильной или гидроксильной группы лиганда) и азот (в одном варианте осуществления, из первичной или вторичной амино группы лиганда). Такие гетероатомы могут присутствовать на лиганде в его природном состоянии, например, в виде природного антитела, или могут быть введены в лиганд через химическую модификацию или биоинженерными методами.

В одном варианте осуществления, группа лиганда содержит сульфгидрильную группу, и группа лиганда связывается с линкерной группой через атом серы сульфгидрильной группы.

В другом варианте осуществления лиганд содержит лизиновые остатки, которые могут взаимодействовать с активированными сложными эфирами (такие сложные эфиры включают, но не ограничиваются этим, N-гидроксисукцинимидный, пентафторфенильный и п-нитрофенильный сложные эфиры) расширяющей группы линкера и, таким образом, образуют амидную связь, состоящую из атома азота группы Лиганда и группы C=O линкера.

Еще в одном аспекте группа лиганда содержит один или несколько лизиновых остатков, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или нескольких сульфгидрильных групп. Группа лиганда связывается с линкерной группой через атом серы сульфгидрильной группы. Реагенты, которые можно использовать для модификации лизинов, включают, но не ограничиваются этим, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолан гидрохлорид (Реагент Траута).

В другом варианте осуществления, группа лиганда может содержать одну или несколько углеводных групп, которые могут быть химически модифицированы таким образом, чтобы они содержали одну или несколько сульфгидрильных групп. Группа лиганда связывается с расширяющей группой линкера через атом серы сульфгидрильной группы.

Еще в одном варианте осуществления, группа лиганда может содержать одну или несколько углеводных групп, которые могут быть окислены с получением альдегидной (-CHO) группы (см., например, Laguzza, et al., 1989, J. Med. Chem. 32 (3):548-55).

Соответствующий альдегид может образовывать связь с реакционноспособным участком в расширяющей группе.

Реакционноспособные участки в расширяющей группе, которые могут взаимодействовать с карбонильной группой в лиганде, включают, но не ограничиваются этим, гидразин и гидроксилламин. Другие протоколы для модификации белков для присоединения или ассоциации групп лекарственных средств описаны в Coliganet al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002) (включен в настоящую заявку посредством ссылки).

Группа лиганда образует связь с реакционноспособной группой в расширяющей группе. Можно использовать самые разнообразные реакционноспособные группы, и это будет зависеть от природы группы лиганда. Реакционноспособная группа может представлять собой малеимид, который присутствует в расширяющей группе (до присоединения к L), и ковалентное присоединение L к расширяющей группе осуществляют через сульфгидрильную группу лиганда с образованием тиозамещенного сукцинимиды. Сульфгидрильная группа может присутствовать в лиганде, когда лиганд находится в природном состоянии, например, имеющий природное происхождение остаток, или может быть введена в лиганд через химическую модификацию.

Еще в одном варианте осуществления лиганд представляет собой антитело, и сульфгидрильная группа образуется путем восстановления межцепьевого дисульфида. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления линкерную группу конъюгируют с цистеиновым остатком восстановленных межцепевых дисульфидов.

Еще в одном варианте осуществления лиганд представляет собой антитело, и сульфгидрильную группу химически вводят в антитело, например путем введения цистеинового остатка. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления расширяющую группу конъюгируют с встроенным цистеиновым остатком.

Что касается биокоъюгатов, было обнаружено, что участок конъюгации лекарственного средства может влиять на ряд параметров, включая простоту конъюгации, стабильность лекарственного средство-линкера, эффекты на биофизические свойства получаемых биокоъюгатов и *in-vitro* цитотоксичность.

Что касается стабильности лекарственного средство-линкера, участок конъюгации лекарственного средство-линкера с лигандом может влиять на способность конъюгированного лекарственного средство-линкера подвергаться реакции элиминирования и на перенос лекарственного средство-линкера от лиганда биокоъюгата к альтернативному реакционноспособному тиолу, присутствующему в окружении биокоъюгата, такому как, например, реакционноспособный тиол в альбумине, свободном цистеине или глутатионе, при нахождении в плазме. Такие участки включают, например, межцепевые дисульфиды, а также определенные цистеиновые сконструированные участки. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство, описанные в настоящей заявке, могут быть конъюгированы с тиоловыми остатками на участках, которые не являются чувствительными к реакции элиминирования (например, положения 239 в соответствии с EU индексом на основании номенклатуры Кэбата), в дополнение к другим участкам.

Когда конъюгаты включают неиммунореактивные белковые, полипептидные или пептидные лиганды вместо антитела, полезные неиммунореактивные белковые, полипептидные или пептидные лиганды включают, но не ограничиваются этим, трансферрин, эпидермальные факторы роста ("EGF"), бомбезин, гастрин, гастрин-высвобождающий пептид, тромбоцитарный фактор роста, IL-2, IL-6, трансформирующие факторы роста ("TGF"), такие как TGF- α и TGF- β , фактор роста осповакцины ("VGF"), инсулин и инсулинподобные факторы роста I и II, соматостатин, лектины и апопротеин из липопротеина низкой плотности.

Особенно предпочтительными лигандами являются антитела, включая интактные антитела. Фактически, в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, группа лиганда может представлять собой антитело. Полезные поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, выделенных из сыворотки иммунизированных животных. Полезные моноклональные антитела представляют собой гомогенные популяции антител к конкретной антигенной детерминанте (например, антигену раковой клетки, вирусному антигену, микробному антигену, белку, пептиду, углеводу, химическому веществу, нуклеиновой кислоте или их фрагментам). Моноклональное антитело (mAb) к представляющему интерес антигену можно получить с использованием любого метода, известного в данной области техники, который обеспечивает получение молекул антител с использованием стабильных клеточных линий в культуре.

Полезные моноклональные антитела включают, но не ограничиваются этим, человеческие моноклональные антитела, гуманизированные моноклональные антитела или химерные человеческие-мышинные (или других видов) моноклональные антитела. Антитела включают полноразмерные антитела и их антиген-связывающие фрагменты. Человеческие моноклональные антитела можно получить любым из многочисленных способов, известных в данной области техники, (например, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; and Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

Антитело может представлять собой функционально активный фрагмент, производное или аналог антитела, который иммуноспецифически связывается с клетками-мишенями (например, антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами) или другими антителами, связанными с опухолевыми клетками или матриксом. В этой связи, "функционально активный" означает, что фрагмент, производное или аналог способен иммуноспецифически связываться с клетками-мишенями. Для определения, какие CDR последовательности связываются с антигеном, синтетические пептиды, содержащие CDR последовательности, можно использовать в анализах связывания с антигеном с использованием любого метода осуществления анализа связывания, известного в данной области техники, (например, ВИА ядерный анализ) (см., например, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md; Rabat E et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

Другие полезные антитела включают фрагменты антител, такие как, но не ограничиваясь этим, F(ab')₂ фрагменты, Fab фрагменты, Fvs, одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетратела, scFv, scFv-FV или любую другую молекулу с такой же специфичностью, как у антитела.

Кроме того, рекомбинантные антитела, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, включающие как человеческие, так и не-человеческие части, которые можно получить с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК, являются полезными антителами. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят из разных видов животных, такие как, например, содержащие вариабельную область, происходящую из мышинового моноклонального, и константные области человеческого иммуноглобулина. (См., например, патент США № 4816567; и Патент США № 4816397, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте).

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из отличных от человека видов, содержащие одну или несколько комплементарно определяемых областей (CDRs) из отличного от человека вида и каркасную область из молекулы человеческого иммуноглобулина. (См., например, Патент США № 5585089, который включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте). Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получить методами рекомбинантных ДНК, известными в данной области техники, например, с использованием способов, описанных в Международной публикации № WO 87/02 671; Европейской патентной публикации № 0 184 187; Европейской патентной публикации № 0 171 496; Европейской патентной публикации № 0 173 494; Международной публикации № WO 86/01533; Патент США № 4816567; Европейской патентной публикации № 012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; and Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Патенте США № 5225539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; и Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060; каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

Полностью человеческие антитела являются особенно желательными, и их можно получить с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, но которые могут экспрессировать гены тяжелой и легкой цепи человека.

Антитела включают аналоги и производные, которые также являются модифицированными, т.е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы, при условии, что такое ковалентное присоединение позволяет антителу сохранять его антиген-связывающую иммуноспецифичность. Например, но не в качестве ограничения, производные и аналоги антител включают такие, которые были дополнительно модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточной единицей антитела или другим белком, и т.д. Можно осуществить любые из многочисленных химических модификаций известными методами, включая, но не ограничиваясь этим, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез в присутствии туникамицина, и т.д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или несколько не встречающихся в природе аминокислот.

Антитела могут иметь модификации (например, замены, делеции или добавления) в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют с Fc рецепторами. В частности, антитела могут содержать модификации в аминокислотных остатках, определяемых как вовлеченные во взаимодействие между анти-Fc доменом и FcRn рецептором (см., например, Международную публикацию № WO 97/34631, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте).

Антитела, иммуноспецифические в отношении антигена раковой клетки, можно получить коммерческим путем или можно получить любым способом, известным специалистам в данной области, таким как, например, химический синтез или рекомбинантные методы экспрессии. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела, иммуноспецифические в отношении антигена раковой клетки, можно получить, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем рутинного клонирования и секвенирования.

В специальном варианте осуществления, можно использовать известные антитела для лечения рака. Антитела, являющиеся иммуноспецифическими в отношении антигена раковой клетки, можно получить коммерческим путем, или их можно получить любым способом, известным специалистам в данной области, таким как, например, рекомбинантные методы экспрессии. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела, иммуноспецифические в отношении антигена раковой клетки, можно получить, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем рутинного клонирования и секвенирования.

В другом специальном варианте осуществления, антитела для лечения аутоиммунного заболевания используют в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Антитела, иммуноспецифические в отношении антигена клетки, который является ответственным за продукцию аутоиммунных антител, можно получить от любой организации (например, от сотрудника университета или компании), или их можно получить любым способом, известным специалистам в данной области, таким как, например, химический синтез или рекомбинантные методы экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления, полезные антитела могут связываться с рецептором или рецепторным комплексом, экспрессируемом на активированном лимфоците. Рецептор или рецепторный комплекс может включать член суперсемейства иммуноглобулиновых генов, член суперсемейства TNF рецепторов, интегрин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, белок главного комплекса гистосовместимости, лектин или белок контроля комплемента.

В некоторых аспектах антитело будет специфически связываться с CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, альфа-в-бета-6, Liv-1 или Lewis Y антигеном.

Анти-CD30 антитело может представлять собой, например, химерное AC10 антитело, брентуксимаб. Анти-CD30 антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, константную область гамма I человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и константную область каппа человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

Анти-CD30 антитело может представлять собой, например, гуманизованное AC10 антитело. Анти-CD30 антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Антитело может дополнительно включать константную область гамма I человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, необязательно имеющую замену серина на цистеин в положении 239 (в соответствии с EU индексом), и константную область каппа человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

Анти-CD70 антитело может представлять собой, например, гуманизованное антитело (см., например, US 2009/0148942). В иллюстративном варианте осуществления, анти-CD70 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

Анти-CD19 антитело может представлять собой, например, гуманизованное антитело (см., например, US 2009/0136526, включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей). В иллюстративном варианте осуществления, hBU12 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Антитело может представлять собой гуманизованное анти-CD33 антитело (US 2013/0309223, включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей), гуманизованное анти-Бетаб антитело (см., например, WO 2013/123152, включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей), гуманизованное анти-Liv-1 антитело (см., например, US 2013/0259860, включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей) или гуманизованное AC10 антитело (см., например, US 8257706, включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей).

Примером присоединения к лиганду является присоединение через тиоэфирные связи. Тиоэфирные связи могут включать связи через межцепевые дисульфидные связи, встроенные цистеиновые остатки и их комбинации.

Группы лекарственного средства

Эффекты настоящего изобретения будут более явно выражены в вариантах осуществления, где лекарственные средства являются гидрофобными по своей природе. Соответственно, лекарственные средства по настоящему изобретению предпочтительно являются гидрофобными по своей природе.

Группа лекарственного средства (D) может представлять собой цитотоксическое, цитостатическое или иммуносупрессивное лекарственное средство, также указанное в настоящем изобретении как цитотоксическое, цитостатическое или иммуносупрессивное средство. Группа лекарственного средства содержит атом, который может образовывать связь с высвобождаемой комплексной группой (X). В некоторых вариантах осуществления группа лекарственного средства D содержит атом азота, который может образовывать связь с высвобождаемой комплексной группой (X). В других вариантах осуществления группа лекарственного средства D содержит карбоновую кислоту, которая может образовывать связь с высвобождаемой комплексной группой (X). В других вариантах осуществления группа лекарственного средства D содержит сульфгидрильную группу, которая может образовывать связь с высвобождаемой комплексной группой X. В некоторых других вариантах осуществления группа лекарственного средства D содержит гидроксильную группу или кетон или спирт, который может образовывать связь с высвобождаемой комплексной группой X.

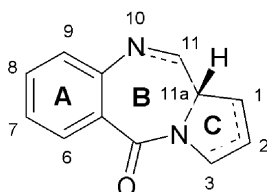
Полезные классы цитотоксических или иммуносупрессивных средств включают, например, антитубулиновые средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы ДНК репликации, алкилирующие средства, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, средства, повышающие чувствительность к химиотерапии, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка или т.п. Конкретные примеры полезных классов цитотоксических средств включают, например, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК алкилирующие средства и ингибиторы тубулина. Примеры цитотоксических средств включают, например, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтансины и майтансиноиды, таксаны, бензодиазепины или бензодиазепинсодержащие лекарственные средства (например, пирроло[1,4]-бензодиазепины (PBDs), индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины) и алкалоиды барвинка. Избранные бензодиазепинсодержащие лекарственные средства описаны в

WO 2010/091150, WO 2012/112708, WO 2007/085930 и WO 2011/023883.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтансин или майтансиноид (например, DM1, DM4), относящийся к другой группе анти-тубулиновых средств. (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131 и Патент США № 8163888).

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство представляет собой бензодиазепин (включая бензодиазепинсодержащие лекарственные средства, например, пирроло[1,4]бензодиазепины (PBDs), индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины).

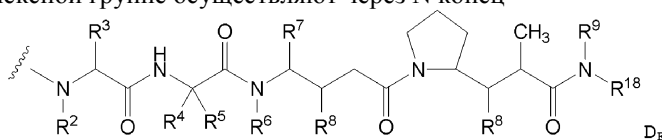
PBDs имеют общую структуру:



но могут отличаться по количеству, типу и положению заместителей, как в их ароматических А кольцах, так и в пирроло С кольцах, и по степени насыщения С кольца. В В-кольце присутствует либо имин (N=C) либо карбиноламин (NH-CH (OH)) либо карбиноламин метиловый эфир (NH-CH(OMe)) в N10-C11 положении, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты имеют (S)-ориентацию в положении хирального C11a, что обеспечивает им изгиб вправо, если смотреть от С кольца в направлении А кольца. Это придает им подходящую трехмерную форму для изоспиральности малой бороздке В-формы ДНК, приводя к точной подгонке на участке связывания. Способность PBDs образовывать продукт присоединения в малой бороздке позволяет им вмешиваться в ДНК процессинг, следовательно, делает возможным их использование в качестве противоопухолевых средств. Биологическую активность этих молекул можно усилить, например, объединив два PBD звена вместе через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы через гибкий алкиленовый линкер. Считают, что PBD димеры образуют последовательность-селективные ДНК повреждения, такие как палиндромная 5'-Pu-GATC-Pu-3' межцепочечная поперечная сшивка, которую считают главным образом ответственной за их биологическую активность.

Группа лекарственного средства может представлять собой, например, ауристатиновое или неауристатиновое лекарственное средство, имеющее гидрофобность сопоставимую или больше чем у монOMETИЛ ауристатина Е. В некоторых аспектах, лекарственное средство представляет собой ММАЕ или ауристатин, имеющий гидрофобность сопоставимую или больше чем у монOMETИЛ ауристатина Е. Ауристатиновое лекарственное средство может быть ковалентно присоединено к высвобождаемой комплексной группе, например, через его N или С конец. ММАЕ имеет SlogP значение 2,59. В некоторых аспектах, лекарственные средства для использования в настоящем изобретении будут иметь SlogP значение 1,5 или больше, 2,0 или больше, или 2,5 или больше. В некоторых аспектах лекарственные средства для использования в настоящем изобретении будут иметь SlogP значение (а) от около 1,5, около 2 или 2,5 до около 7, (b) от около 1,5, около 2 или 2,5 до около 6, (с) от около 1,5, около 2 или около 2,5 до около 5, (d) от около 1,5, около 2 или 2,5 до около 4, или (е) от около 1,5, около 2 или около 2,5 до около 3.

Группа лекарственного средства может иметь формулу D_E, показанную ниже, где присоединение к высвобождаемой комплексной группе осуществляют через N конец



где независимо в каждом положении

R² выбран из группы, состоящей из H и C₁-C₈ алкила;

R³ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла, арила, C₁-C₈ алкиларила, C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ карбоцикл), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ гетероцикл);

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла, арила, C₁-C₈ алкиларила, C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ карбоцикл), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ гетероцикл);

R⁵ выбран из группы, состоящей из H и метила;

или R⁴ и R⁵ вместе образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу -(CR^aR^b)_n-, где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из H, C₁-C₈ алкила и C₃-C₈ карбоцикла, и n выбран из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5 и 6;

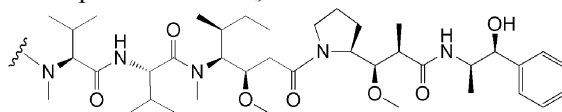
R⁶ выбран из группы, состоящей из H и C₁-C₈ алкила;

R⁷ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла, арила, C₁-C₈ алкиларила, C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ карбоцикл), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ гетероцикл);

каждый R⁸ независимо выбран из группы, состоящей из H, OH, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла и O-(C₁-C₈ алкил);

R⁹ выбран из группы, состоящей из H и C₁-C₈ алкила;

R^{18} выбран из группы, состоящей из $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арила, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ гетероцикл) и $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ карбоцикл).
ММАЕ, конъюгированный через его N конец, показан ниже



В некоторых вариантах осуществления группа лекарственного средства представляет собой алкалоид барвинка, камптотециновое или антрациклиновое цитотоксическое соединение. Иллюстративные структуры таких групп лекарственного средства, когда они присутствуют в X-D части, описаны в настоящей заявке для промежуточных соединений лекарственное средство-линкер.

Существует множество различных анализов, которые можно использовать для определения имеет или нет конъюгат лиганд-лекарственное средство цитостатический или цитотоксический эффект на клеточную линию. В одном примере для определения имеет или нет конъюгат лиганд-лекарственное средство цитостатический или цитотоксический эффект на клеточную линию используют анализ с включением тимидина. Например, клетки при плотности 5000 клеток/луночка высевают в 96-луночный планшет и культивируют в течение 72-часового периода времени и подвергают воздействию 0,5 мкКи 3H -тимидина в течение последних 8 ч этого 72-часового периода, и включение 3H -тимидина в клетках культуры измеряют в присутствии и в отсутствие конъюгата лиганд-лекарственное средство. Конъюгат лиганд-лекарственное средство имеет цитостатический или цитотоксический эффект на клеточную линию, если клетки культуры имеют уменьшенное включение 3H -тимидина по сравнению с клетками той же самой клеточной линии, культивируемыми в тех же самых условиях, но не контактирующими с конъюгатом лиганд-лекарственное средство.

В другом примере, для определения имеет или нет конъюгат лиганд-лекарственное средство цитостатический или цитотоксический эффект на клеточную линию, клеточную жизнеспособность измеряют путем определения в клетке поглощения красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий или ALAMAR™ синий (см., например, Page et al., 1993, Intl. J. of Oncology 3:473-476). В таком анализе, клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, клетки промывают и оставшийся краситель, отражающий клеточное поглощение красителя, измеряют спектрофотометрически. Связывающийся с белком краситель сульфородамин В (SRB) также можно использовать для измерения цитотоксичности (Skehan et al., 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). Предпочтительные конъюгаты лиганд-лекарственное средство включают такие, которые имеют IC_{50} значение (определенное как mAB концентрация, которая обеспечивает 50% клеточную гибель) меньше чем 1000 нг/мл, предпочтительно меньше чем 500 нг/мл, более предпочтительно меньше чем 100 нг/мл, и наиболее предпочтительно меньше чем 50 или даже меньше чем 10 нг/мл на клеточной линии.

Общие процедуры для связывания лекарственного средства с линкерами известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 8163888, 7659241, 7498298, Публикацию США № US 20110256157 и Международные заявки №№ WO 2011023883 и WO 2005112919.

Группа Полиэтиленгликоля (ПЭГ)

Полидисперсные ПЭГ, монодисперсные ПЭГ и дискретные ПЭГ можно использовать для получения Соединений по настоящему изобретению. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ типично являются очищенными из гетерогенных смесей и поэтому обеспечивают нужную длину отдельной цепи и молекулярную массу. Предпочтительные ПЭГ группы представляют собой дискретные ПЭГ, соединения, которые синтезируют поэтапно, а не через процесс полимеризации. Дискретные ПЭГ обеспечивают отдельную молекулу с определенной и заданной длиной цепи.

ПЭГ группа, обеспечиваемая в настоящем изобретении, включает одну или несколько цепей полиэтиленгликоля. Полиэтиленгликольные цепи могут быть связаны вместе, например, в линейной, разветвленной или звездчатой конфигурации. Типично, по меньшей мере одна из ПЭГ цепей является дериватизированной на одном конце для ковалентного присоединения к параллельному соединительному звену. Примеры присоединений к параллельному соединительному звену включают присоединение через неусловнорасщепляемые связи или через условнорасщепляемые связи. Примеры присоединений включают присоединение через амидную связь, простые эфирные связи, сложные эфирные связи, гидразоновые связи, оксимные связи, дисульфидные связи, пептидные связи или триазольные связи. В некоторых аспектах присоединение к L^P осуществляют посредством не-условнорасщепляемой связи. В некоторых аспектах присоединение к L^P осуществляют не через сложноэфирную связь, гидразоновую связь, оксимную связь или дисульфидную связь. В некоторых аспектах присоединение к L^P осуществляют не через гидразоновую связь.

Условнорасщепляемая связь относится к связи, которая не является по существу чувствительной к расщеплению при циркуляции в плазме, но является чувствительной к расщеплению во внутриклеточной или внутриопухолевой среде. Неусловнорасщепляемая связь представляет собой такую, которая не является по существу чувствительной к расщеплению в любом биологическом окружении. Химиче-

ский гидролиз гидразона, восстановление дисульфида и ферментативное расщепление пептидной связи или гликозидной связи являются примерами условнорасщепляемой связи.

ПЭГ группа непосредственно присоединяется к конъюгату лиганд-лекарственное средство (или его промежуточному соединению) на параллельном соединительном звене. Другой конец (или концы) ПЭГ группы будут свободными и неограниченными и могут принимать форму метокси, карбоновой кислоты, спирта или другой подходящей функциональной группы. Метокси, карбоновая кислота, спирт или другая подходящая функциональная группа действует как "кэп" для концевой ПЭГ субъединицы ПЭГ Группы. Под термином неограниченный подразумевается, что ПЭГ группа не будет присоединяться на этом неограниченном участке к группе лекарственного средства, к группе лиганда или к связываемому компоненту, который связывает группу лекарственного средства и/или группу лиганда. Для тех вариантов осуществления, где ПЭГ группа включает больше чем одну ПЭГ цепь, эти несколько ПЭГ цепей могут представлять собой одинаковые или отличные друг от друга химические группы (например, ПЭГ, имеющие разную молекулярную массу или количество субъединиц). Эти несколько ПЭГ цепей присоединяют к параллельному соединительному звену на одном участке присоединения. Специалистам должно быть понятно, что ПЭГ группа, в дополнение к тому, что она включает повторяющиеся субъединицы полиэтиленгликоля, также может содержать не-ПЭГ материал (например, как способствующий связыванию нескольких ПЭГ цепей друг с другом или как способствующий связыванию с параллельным соединительным звеном). Не-ПЭГ материал относится к атомам в ПЭГ группе, которые не являются частью повторяющихся $-CH_2CH_2O-$ субъединиц. В вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, ПЭГ группа может включать две мономерные ПЭГ цепи, связанные друг с другом через не-ПЭГ элементы. В других вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, ПЭГ группа может включать две линейные ПЭГ цепи, присоединенные к центральному ядру, которое присоединяется к параллельному соединительному звену (т.е. ПЭГ группа сама является разветвленной).

Существует множество способов присоединения ПЭГ, известных специалистам в данной области [см., например, Goodson, et al. (1990) *Bio/Technology* 8:343 (пегилирование интерлейкина-2 на его участке гликозилирования после сайт-направленного мутагенеза); EP 0401384 (связывание ПЭГ с G-CSF); Malik, et al., (1992) *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (пегилирование GM-CSF с использованием трезилхлорида); АСТ Публикация № WO 90/12874 (пегилирование эритропоэтина, содержащего рекомбинантно встроенный цистеиновый остаток, с использованием цистеин-специфического мПЭГ производного); патент США № 5757078 (пегилирование ЕРО пептидов); патент США № 5672662 (поли(этиленгликоль) и родственные полимеры, монозамещенные пропионой или бутановой кислотой и их функциональные производные для биотехнических применений); патент США № 6077939 (пегилирование N-концевого .альфа.-углерода пептида); Veronese et al., (1985) *Appl. Biochem. Biochnol* 11:141-142 (пегилирование N-концевого α -углерода пептида с использованием ПЭГ-нитрофенилкарбоната ("ПЭГ-NPC") или ПЭГ-трихлорфенилкарбоната); и Veronese (2001) *Biomaterials* 22:405-417 (обзорная статья о пегилировании пептидов и белков)].

Например, ПЭГ можно ковалентно связывать с аминокислотными остатками через реакционноспособную группу. Реакционноспособные группы представляют собой такие, с которыми может связываться активированная ПЭГ молекула (например, свободная амино или карбоксильная группа). Например, N-концевые аминокислотные остатки и лизиновые (K) остатки содержат свободную амино группу; и C-концевые аминокислотные остатки содержат свободную карбоксильную группу. Сульфгидрильные группы (например, присутствующие в цистеиновых остатках) также можно использовать в качестве реакционноспособной группы для присоединения ПЭГ. Кроме того, были описаны ферментативные способы для введения активированных групп (например, гидразидных, альдегидных и ароматических амино групп) конкретно на C-конце полипептида (см. Schwarz, et al. (1990) *Methods Enzymol.* 184:160; Rose, et al. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2:154; и Gaertner, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:7224].

В некоторых вариантах осуществления, ПЭГ молекулы можно присоединять к амино группам с использованием метоксилированного ПЭГ ("мПЭГ"), содержащего различные реакционноспособные группы. Неограничивающие примеры таких реакционноспособных групп включают сукцинимидилсукцинат (SS), сукцинимидилкарбонат (SC), мПЭГ-имидат, пара-нитрофенилкарбонат (NPC), сукцинимидилпропионат (SPA) и хлорангидрид циануровой кислоты. Неограничивающие примеры таких мПЭГ включают мПЭГ-сукцинимидилсукцинат (мПЭГ-SS), мПЭГ₂-сукцинимидилсукцинат (мПЭГ₂-SS); мПЭГ-сукцинимидилкарбонат (мПЭГ-SC), мПЭГ₂-сукцинимидилкарбонат (мПЭГ₂-SC); мПЭГ-имидат, мПЭГ-пара-нитрофенилкарбонат (мПЭГ-NPC), мПЭГ-имидат; мПЭГ₂-пара-нитрофенилкарбонат (мПЭГ₂-NPC); мПЭГ-сукцинимидилпропионат (мПЭГ-SPA); мПЭГ₂-сукцинимидилпропионат (мПЭГ₂--SPA); мПЭГ-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ-NHS); мПЭГ₂-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ₂--NHS); мПЭГ-хлорангидрид циануровой кислоты; мПЭГ₂-хлорангидрид циануровой кислоты; мПЭГ₂-лизинол-NPC и мПЭГ₂-Lys-NHS.

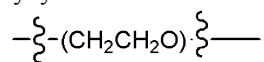
Как правило, по меньшей мере одна из ПЭГ цепей, которые составляют ПЭГ группу, функционализована таким образом, чтобы она могла привоединяться к параллельному соединительному звену. Функционализацию можно осуществлять, например, через амин, тиол, NHS сложный эфир, малеимид, алкин, азид, карбонил или другую функциональную группу. ПЭГ группа может дополнительно включать

не-ПЭГ материал (т.е. материал, не состоящий из $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) как способствующий связыванию с параллельным соединительным звеном или как способствующий связыванию двух или более ПЭГ цепей.

Можно использовать множество разнообразных соединений полиэтиленгликоля (ПЭГ), и можно использовать по существу любой подходящий реакционноспособный ПЭГ реагент. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособный ПЭГ реагент будет приводить к образованию карбаматной или амидной связи при присоединении к L^{P} . Следующие ПЭГ реагенты являются полезными в различных вариантах осуществления: мПЭГ₂-NHS, мПЭГ₂-ALD, ПЭГ с разветвленной структурой, мПЭГ(MAL)₂, мПЭГ₂ (MAL), мПЭГ-NH₂, мПЭГ-SPA, мПЭГ-SBA, мПЭГ-тиозфиры, мПЭГ-две сложноэфирные группы, мПЭГ-ВТС, мПЭГ-ButyrALD, мПЭГ-АСЕТ, гетерофункциональные ПЭГ (NH₂-ПЭГ-COOH, Вос-ПЭГ-NHS, Fmoc-ПЭГ-NHS, NHS-ПЭГ-VS, NHS-ПЭГ-MAL), ПЭГ акрилаты (ACRL-ПЭГ-NHS), ПЭГ-фосфолипиды (например, мПЭГ-DSPE), ПЭГ с разветвленной структурой серии SUNBRITE™, включая GL серию ПЭГ на основе глицерина, активированных химическими способами, выбираемыми специалистами в данной области, любой из SUNBRITE активированных ПЭГ (включая, но не ограничиваясь этим карбоксил-ПЭГ группы, p-NP-ПЭГ группы, трезил-ПЭГ группы, альдегид ПЭГ группы, ацеталь-ПЭГ группы, amino-ПЭГ группы, тиол-ПЭГ группы, малеимидо-ПЭГ группы, гидроксил-ПЭГ-амин, amino-ПЭГ-COOK гидроксил-ПЭГ-альдегид, ангидрид карбоновой кислоты-ПЭГ, функционализированный ПЭГ-фосфолипид и другие подобные и/или подходящие реакционноспособные ПЭГ, выбираемые специалистами в данной области для конкретных целей и применения.

Добавление ПЭГ группы может иметь два потенциальных действия на фармакокинетику получаемого конъюгата лиганд-лекарственное средство. Желаемое действие заключается в снижении клиренса (и, как результат, в усилении воздействия), что происходит в результате уменьшения не-специфических взаимодействий, индуцируемых незащищенными гидрофобными элементами лекарственного средства-линкера. Второе действие является нежелательным действием и заключается в уменьшении объема и скорости дистрибуции, что может происходить в результате увеличения молекулярной массы конъюгата лиганд-лекарственное средство. Увеличение количества ПЭГ субъединиц увеличивает гидродинамический радиус конъюгата, приводя к пониженной способности к диффузионному переносу. В свою очередь, пониженная способность к диффузионному переносу может снижать способность конъюгата лиганд-Лекарственное средство проникать в опухоль (Schmidt and Wittrup, Mol Cancer Ther 2009;8:2861-2871). Из-за этих двух конкурирующих фармакокинетических эффектов желательно использовать ПЭГ, который является достаточно большим для снижения LDC клиренса, таким образом, увеличивая содержание вещества в плазме, но не достаточно большим для сильного снижения его способности к диффузионному переносу, что может снижать способность конъюгата лиганд-лекарственное средство достигать нужной популяции клеток-мишеней. Принципы выбора оптимального размера ПЭГ для конкретного лекарственного средства-линкера см. в примерах (например, примеры 1, 18 и 21).

В одной группе вариантов осуществления, ПЭГ группа включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц, по меньшей мере 18 субъединиц, по меньшей мере 19 субъединиц, по меньшей мере 20 субъединиц, по меньшей мере 21 субъединицу, по меньшей мере 22 субъединицы, по меньшей мере 23 субъединицы или по меньшей мере 24 субъединицы. В контексте настоящего изобретения, субъединица при ссылке на ПЭГ группу относится к субъединице полиэтиленгликоля, имеющей формулу



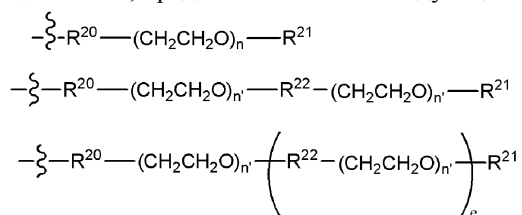
В некоторых таких вариантах осуществления, ПЭГ группа включает не больше чем около 72 субъединиц.

В одной группе вариантов осуществления ПЭГ группа включает одну или несколько линейных ПЭГ цепей, каждая из которых содержит по меньшей мере 2 субъединицы, по меньшей мере 3 субъединицы, по меньшей мере 4 субъединицы, по меньшей мере 5 субъединицы, по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц, по меньшей мере 18 субъединиц, по меньшей мере 19 субъединиц, по меньшей мере 20 субъединиц, по меньшей мере 21 субъединицу, по меньшей мере 22 субъединицы, по меньшей мере 23 субъединицы или по меньшей мере 24 субъединицы. В предпочтительных вариантах осуществления, ПЭГ группа включает в целом по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10 субъединиц или по меньшей мере 12 субъединиц. В некоторых таких вариантах осуществления, ПЭГ группа включает в целом не больше чем около 72 субъединиц, предпочтительно в целом не больше чем около 36 субъединиц.

В другой группе вариантов осуществления, ПЭГ группа включает в целом от 4 до 72, от 4 до 60, от

от 5 до 48, от 5 до 36 или от 5 до 2 4 субъединиц.

Примеры линейных ПЭГ групп, которые можно использовать в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, представляют собой следующие:



где волнистая линия указывает участок присоединения к параллельному соединительному звену,

R^{20} представляет собой группу ПЭГ присоединения,

R^{21} представляет собой ПЭГ-блокирующую группу;

R^{22} представляет собой ПЭГ-связывающую группу (т.е. для связывания нескольких цепей субъединиц ПЭГ вместе)

n независимо выбран из значений от 2 до 72 (предпочтительно от 4 до 72, более предпочтительно от 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72 или от 6 до 24);

e имеет значение от 2 до 5

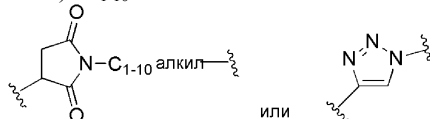
каждый n' независимо выбран из значений от 1 до 72. В предпочтительных вариантах осуществления, в ПЭГ группе присутствует по меньшей мере 6, предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 12 субъединиц ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления, в ПЭГ группе присутствует не больше чем 72 или 36 субъединиц ПЭГ.

В предпочтительных вариантах осуществления n имеет значение 8 или около 8, 12 или около 12, 24 или около 24.

Группа ПЭГ присоединения является частью ПЭГ группы и действует как связывающая ПЭГ группу с параллельным соединительным звеном. В этой связи параллельное соединительное звено содержит функциональную группу, которая образует связь с ПЭГ группой. Функциональные группы для присоединения ПЭГ группы к параллельному соединительному звену включают сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей или тиоэфирных связей, альдегидные, кетоновые или гидразиновые группы для образования гидразоновых связей, гидроксилы для образования оксимных связей, карбоксильные или амино группы для образования пептидных связей, карбоксильные или гидроксильные группы для образования сложноэфирных связей, сульфоновые кислоты для образования сульфонамидных связей, спирты для образования карбаматных связей и амины для образования сульфонамидных связей или карбаматных связей или амидных связей. Соответственно, ПЭГ группа может быть присоединена к Параллельному Соединительному Звену, например, через дисульфидную, тиоэфирную, гидразоновую, оксимную, пептидную, сложноэфирную, сульфонамидную, карбаматную или амидную связь. Типично, Группа ПЭГ Присоединения представляет собой продукт реакции циклоприсоединения, присоединения, присоединения/элиминирования или замещения, которая происходит при присоединении ПЭГ группы к Параллельному Соединительному Звену.

ПЭГ-Связывающая Группа является частью ПЭГ группы и представляет собой не относящийся к ПЭГ элемент, который действует, соединяя две или более цепей повторяющихся CH_2CH_2O -субъединиц. В иллюстративных вариантах осуществления, ПЭГ-связывающая Группа R^{22} представляет собой $-C_{1-10}$ алкил- $C(O)-NH-$, $-C_{1-10}$ алкил- $NH-C(O)-$, $-C_{2-10}$ алкил- $NH-$, $-C_{2-10}$ алкил- $O-$, $-C_{1-10}$ алкил- $S-$ или $-C_{2-10}$ алкил- $NH-$.

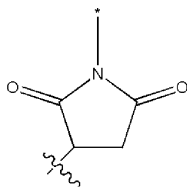
В иллюстративных вариантах осуществления группа ПЭГ присоединения R^{20} представляет собой $-C(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-NH-$, $-C(O)O-$, $-C(O)C_{1-10}$ алкил, $-C(O)C_{1-10}$ алкил- $O-$, $-C(O)C_{1-10}$ алкил- CO_2- , $-C(O)C_{1-10}$ алкил- $NH-$, $-C(O)C_{1-10}$ алкил- $S-$, $-C(O)C_{1-10}$ алкил- $C(O)-NH-$, $-C(O)C_{1-10}$ алкил- $NH-C(O)-$, $-C_{1-10}$ алкил, $-C_{1-10}$ алкил- $O-$, $-C_{1-10}$ алкил- CO_2- , $-C_{1-10}$ алкил- $NH-$, $-C_{1-10}$ алкил- $S-$, $-C_{1-10}$ алкил- $C(O)-NH-$, $-C_{1-10}$ алкил- $NH-C(O)-$, $-CH_2CH_2SO_2-C_{1-10}$ алкил-, $-CH_2C(O)-C_{1-10}$ алкил-, $=N-(O \text{ или } N)-C_{1-10}$ алкил- $O-$, $=N-(O \text{ или } N)-C_{1-10}$ алкил- $NH-$, $=N-(O \text{ или } N)-C_{1-10}$ алкил- CO_2- , $=N-(O \text{ или } N)-C_{1-10}$ алкил- $S-$



каждый R^{21} независимо представляет собой $-C_{1-10}$ алкил, $-C_{2-10}$ алкил- CO_2H , $-C_{2-10}$ алкил- OH , $-C_{2-10}$ алкил- NH_2 , C_{2-10} алкил- $NH(C_{1-3}$ алкил) или C_{2-10} алкил- $N(C_{1-3}$ алкил) $_2$; и

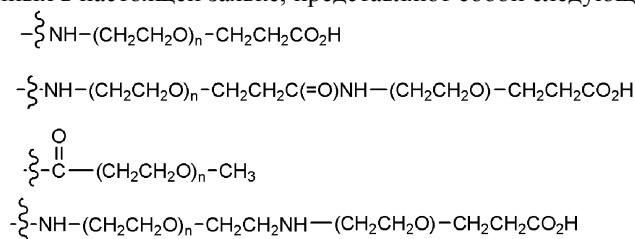
каждый R^{22} независимо представляет собой $-C_{1-10}$ алкил- $C(O)-NH-$, $-C_{1-10}$ алкил- $NH-C(O)-$, $-C_{2-10}$ алкил- $NH-$, $-C_{2-10}$ алкил- $O-$, $-C_{1-10}$ алкил- $S-$ или $-C_{2-10}$ алкил- $NH-$.

В некоторых вариантах осуществления R^{20} представляет собой $-NH-$, $-C(=O)-$, триазолсвязанные группы или $-S-$ или маленимидо-связанные группы, такие как



где волнистая линия указывает участок присоединения к параллельному соединительному звену, и звездочка указывает участок присоединения в ПЭГ группе. В некоторых таких аспектах R^{21} представляет собой C_{1-10} алкил, $-C_{2-10}$ алкил- CO_2H , $-C_{2-10}$ алкил-ОН или $-C_{2-10}$ алкил- NH_2 .

Иллюстративные линейные ПЭГ группы, которые можно использовать в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, представляют собой следующие:



где волнистая линия указывает участок присоединения к Параллельному Соединительному Звену, и каждый ξ независимо выбран из значений от 4 до 72, от 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72, от 6 до 24 или от 8 до 24. В некоторых аспектах, ξ имеет значение около 8, около 12 или около 24.

Как описано в настоящей заявке, ПЭГ группу выбирают таким образом, чтобы она улучшала клиренс получаемого конъюгата лиганд-лекарственное средство, но существенно не влияла на способность конъюгата проникать в опухоль. В вариантах осуществления, где группа лекарственного средства и высвобождаемая комплексная группа конъюгата лиганд-лекарственное средство имеет гидрофобность, сопоставимую с гидрофобностью малеимидоглиукуронидного ММАЕ лекарственного средства-линкера (как показано в примерах), ПЭГ группа, которую выбирают для использования, предпочтительно должна содержать от 8 субъединиц до около 24 субъединиц, более предпочтительно около 12 субъединиц. В вариантах осуществления, где группа лекарственного средства и высвобождаемая комплексная группа конъюгата имеет гидрофобность больше чем гидрофобность малеимидо глиукуронидного ММАЕ лекарственного средства-линкера, можно выбрать ПЭГ группу с большим количеством субъединиц. Методы, показанные в разделе Примеры, можно использовать для определения идеального количества субъединиц для конкретного лекарственного средства-линкера.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, ПЭГ группа имеет массу от около 300 до около 5 кДа; от около 300 Да, до около 4 кДа; от около 300 Да до около 3 кДа; от около 300 Да до около 2 кДа; или от около 300 Да до около 1 кДа. В некоторых таких аспектах ПЭГ группа содержит по меньшей мере 6 субъединиц или по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц. В некоторых таких аспектах, ПЭГ группа содержит по меньшей мере 6 субъединиц или по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц, но не больше чем 72 субъединицы, предпочтительно не больше чем 36 субъединиц.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, никакая другая ПЭГ субъединица, помимо ПЭГ группы, не присутствует в лекарственном средстве-линкере (т.е. никаких ПЭГ субъединиц нет ни в каких других компонентах конъюгатов и линкеров, представленных в настоящей заявке). В других аспектах настоящего изобретения помимо ПЭГ группы в лекарственном средстве-линкере присутствуют не больше чем 8, не больше чем 7, не больше чем 6, не больше чем 5, не больше чем 4, не больше чем 3, не больше чем 2 или не больше чем 1 других субъединиц полиэтиленгликоля (т.е. не больше чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 других субъединиц полиэтиленгликоля в других компонентах конъюгатов и линкеров, представленных в настоящей заявке). Компоненты включают расширяющую группу, параллельное соединительное звено, группу лекарственного средства, разветвляющуюся группу и высвобождаемую комплексную группу.

Должно быть понятно, что при ссылке на ПЭГ субъединицу, и в зависимости от контекста, количество субъединиц может представлять собой среднее количество, например, при ссылке на популяцию конъюгатов лиганд-лекарственное средство или промежуточные соединения и при использовании полидисперсных ПЭГ.

Расширяющая группа:

Расширяющая Группа (-Z-) выполняет функцию связывания группы лиганда с параллельным соединительным звеном. В этой связи расширяющая группа содержит функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой лиганда. Расширяющая группа также содержит функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой либо необязательной разветвляющейся группы либо параллельного соединительного звена. В конъюгате лиганд-лекарственное средство и промежуточных соединениях, содержащих больше чем одну группу лекарст-

венного средства на ПЭГ группу, расширяющая группа будет содержать функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой лиганда, и функциональную группу, которая может образовывать связь с разветвляющейся группой, параллельным соединительным звеном или группой присоединения лекарственного средства. Полезные функциональные группы, которые могут присутствовать в группе лиганда, либо естественным образом, либо через химическую манипуляцию, включают, но не ограничиваются этим, сульфгидрил (-SH), amino, гидроксил, карбокси, аномерную гидроксильную группу углевода и карбоксил. В одном аспекте функциональные группы в лиганде представляют собой сульфгидрил и amino. расширяющая группа может включать например, малеимидную группу, альдегид, кетон, карбонил или галогенацетамид для присоединения к группе лиганда.

В некоторых аспектах расширяющая группа соединения лекарственное средство-линкер или промежуточного линкерного соединения содержит электрофильную группу, которая способна к взаимодействию с нуклеофильной группой, присутствующей на лиганде (например, антители). Полезные нуклеофильные группы на лиганде включают, но не ограничиваются этим, сульфгидрильную, гидроксильную и amino группы. Гетероатом нуклеофильной группы лиганда способен к взаимодействию с электрофильной группой на расширяющей группе и образует ковалентную связь с расширяющей группой. Полезные электрофильные группы включают, но не ограничиваются этим, малеимидные и галогенацетамидные группы. Для антитела в качестве лиганда электрофильная группа обеспечивает удобный участок для присоединения антитела для тех антител, которые содержат доступную нуклеофильную группу.

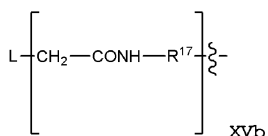
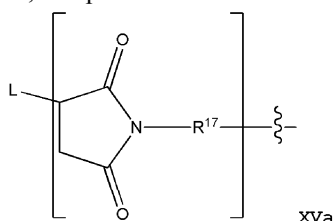
В другом варианте осуществления расширяющая группа содержит реакционноспособный участок, который содержит нуклеофильную группу, которая способна к взаимодействию с электрофильной группой, присутствующей на лиганде (например, антители). Полезные электрофильные группы на лиганде включают, но не ограничиваются этим, альдегид и кетон и карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы расширяющей группы может взаимодействовать с электрофильной группой лиганда и образовывать ковалентную связь с антителом. Полезные нуклеофильные группы на расширяющей группе включают, но не ограничиваются этим, гидразид, гидроксилламин, amino, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид. Для антитела в качестве лиганда, электрофильная группа антитела обеспечивает удобный участок для присоединения к нуклеофильной расширяющей группе.

В некоторых аспектах конъюгаты можно получить с использованием части расширяющей группы, содержащей реакционноспособный участок для связывания с параллельным соединительным звеном и введения другой части расширяющей группы, содержащей реакционноспособный участок для группы лиганда. В одном аспекте расширяющая группа содержит реакционноспособный участок, который содержит электрофильную группу, которая способна к взаимодействию с нуклеофильной группой, присутствующей на лиганде, такой как антители. Электрофильная группа обеспечивает удобный участок для присоединения лиганда (например, антитела). Полезные нуклеофильные группы в антителе включают, но не ограничиваются этим, сульфгидрил, гидроксил и amino группы. Гетероатом нуклеофильной группы антитела способен к взаимодействию с электрофильной группой расширяющей группы и образует ковалентную связь с расширяющей группой. Полезные электрофильные группы включают, но не ограничиваются этим, малеимидные и галогенацетамидные группы и NHS сложные эфиры.

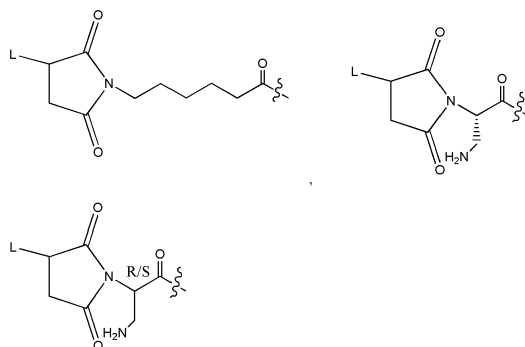
В другом варианте осуществления расширяющая группа содержит реакционноспособный участок, который содержит нуклеофильную группу, которая способна к взаимодействию с электрофильной группой, присутствующей на лиганде. Электрофильная группа на лиганде (например, антители) обеспечивает удобный участок для присоединения к расширяющей группе. Полезные электрофильные группы на антителе включают, но не ограничиваются этим, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы расширяющей группы может взаимодействовать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с антителом. Полезные нуклеофильные группы в расширяющей группе включают, но не ограничиваются этим, гидразид, оксим, amino, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид.

В некоторых вариантах осуществления расширяющая группа образует связь с атомом серы лиганда через малеимидную группу расширяющей группы. Атом серы может происходить из сульфгидрильной группы лиганда. Репрезентативные расширяющие группы этого варианта осуществления включают группы в квадратных скобках Формул XVa и XVb, где волнистая линия указывает присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, и R¹⁷ представляет собой -C₁-C₁₀ алкилен, C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈ карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкил)-, -арилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₃-C₈ гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-C(=O)-, -C₃-C₈ карбоцикло-C(=O)-, -O-(C₁-C₈ алкил)-C(=O)-, -арилен-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-C(=O)-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-C(=O)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₃-C₈ гетероцикло-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-C(=O)-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-NH-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-NH-, -C₃-C₈ карбоцикло-NH-, -O-(C₁-C₈ алкил)-NH-, -арилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-NH-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-NH-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₃-C₈ гетероцикло-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-NH-, -(C₃-C₈

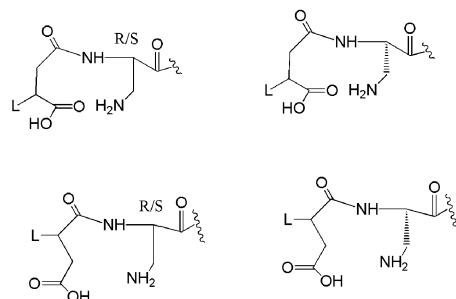
гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-S-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-S-, -C₃-C₈ карбоцикло-S-, -O-(C₁-C₈ алкил)-S-, -арилен-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-S-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-S-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-S-, -C₃-C₈ гетероцикло-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-S- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-S-. Любой из R¹⁷ заместителей может быть замещенным или незамещенным. В некоторых аспектах R¹⁷ заместители являются незамещенными. В некоторых аспектах, R¹⁷ заместители необязательно замещены. В некоторых аспектах R¹⁷ группы необязательно замещены щелочной группой, например -(CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где x представляет собой целое число, имеющее значение 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ гелогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы. Должно быть понятно, даже когда это явно не указано, что r имеет значение от 1 до 14.



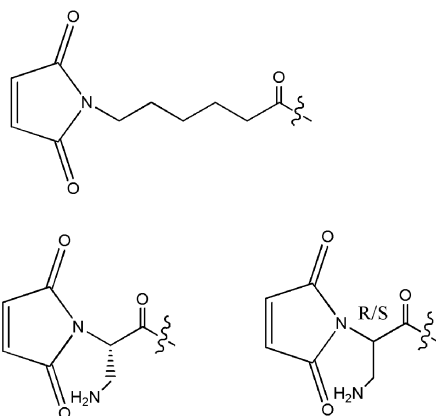
Иллюстративная расширяющая группа представляет собой группу формулы Xva, где R¹⁷ представляет собой -C₂-C₅ алкилен-C(=O)-, где алкилен необязательно замещен щелочной группой, например (CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где x представляет собой целое число, имеющее значение от 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ гелогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы. Иллюстративные варианты осуществления представляют собой следующие:



Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид может существовать в гидролизованной форме, как показано ниже

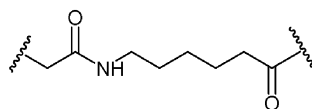


Иллюстративные расширяющие группы до конъюгации с лигандом, включают следующие:

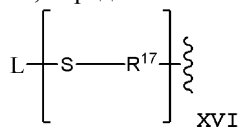


Должно быть понятно, что аминогруппа расширяющей группы может быть подходящим образом защищена аминозащитной группой в процессе синтеза, например кислотолabileй защитной группой (например, BOC).

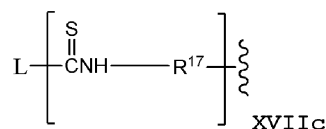
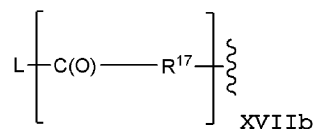
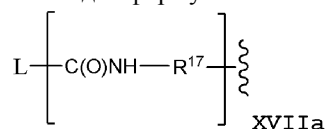
Еще одна иллюстративная расширяющая группа представляет собой группу формулы XVb, где R¹⁷ представляет собой -(CH₂)₅-



В другом варианте осуществления расширяющая группа связана с группой лиганда через дисульфидную связь между атомом серы лиганда и атомом серы расширяющей группы. Репрезентативная расширяющая группа этого варианта осуществления представлена в квадратных скобках формулы XVI, где волнистая линия указывает присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, и R¹⁷ имеет значение, определенное выше для формулы XVa и XVb.

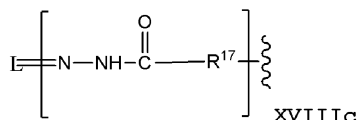
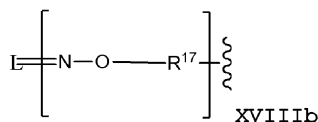
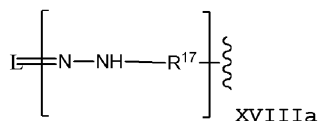


Еще в одном варианте осуществления, реакционноспособная группа расширяющей группы содержит реакционноспособный участок, который может образовывать связь с первичной или вторичной аминогруппой лиганда. Примеры этих реакционноспособных участков включают, но не ограничиваются этим, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидные эфиры, 4-нитрофениловые эфиры, пентафторфениловые эфиры, тетрафторфениловые эфиры, ангидриды, хлорангидриды кислот, сульфонила хлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные Расширяющие Группы этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул XVIIa, XVIIb и XVIIc, где волнистая линия указывает присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, и R¹⁷ имеет значение, определенное выше для формулы XVa и XVb.

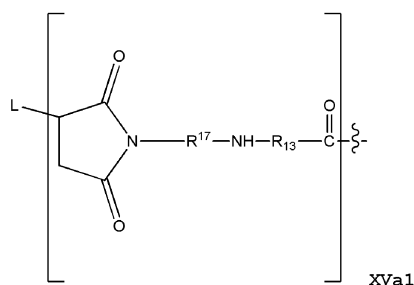


Еще в одном варианте осуществления, реакционноспособная группа Расширяющей Группы содержит реакционноспособный участок, который способен к взаимодействию с (-CHO) группой модифицированного углевода, которая может присутствовать на лиганде. Например, углевод можно слегка окислить с использованием реагента, такого как периодат натрия, и полученную (-CHO) группу окисленного углевода можно подвергнуть конденсации с расширяющей группой, которая содержит функциональную группу, такую как гидразид, оксим, первичный или вторичный амин, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид, такую как группы, описанные в Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate

Chem. 2:133-41. Репрезентативные расширяющие группы этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул XVIIIa, XVIIIb и XVIIIc, где волнистая линия указывает присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, и R¹⁷ имеет значение, определенное выше для формул XVa и XVb.



В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, желательно увеличить длину расширяющей группы. Соответственно, расширяющая группа может включать дополнительные компоненты. Например расширяющая группа может включать группы, показанные в квадратных скобках формул XVa1,



где волнистая линия указывает присоединение к остальной части конъюгата лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединений;

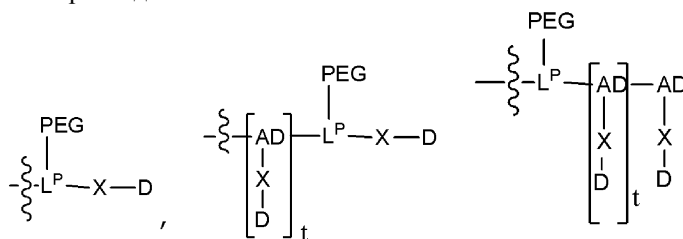
R¹⁷ имеет значение, определенное выше, предпочтительно R¹⁷ представляет собой -C₂-C₅ алкилен-C(=O)-, где алкилен необязательно замещен щелочной группой, например, -(CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где x представляет собой целое число, имеющее значение от 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы; и

R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен-, -C₃-C₈карбоцикло-, -арил-, -C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈гетероцикло-, -C₁-C₁₀алкилен-арил-, -арил-C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈карбоцикло)-, -(C₃-C₈карбоцикло)-C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-. В предпочтительных вариантах осуществления R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен-.

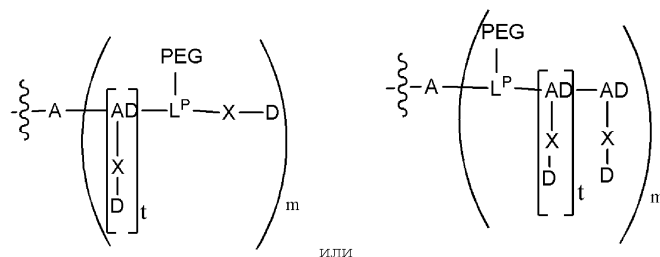
В предпочтительных аспектах настоящего изобретения расширяющая группа имеет массу не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 500 Да, не больше чем около 200 Да, от около 30, 50 или 100 до около 1000 Да, от около 30, 50 или 100 Да до около 500 Да, или от около 30, 50 или 100 Да до около 200 Да.

Необязательная разветвляющаяся группа (A)

Разветвляющуюся группу включают в конъюгаты лиганд-лекарственное средство в случаях, когда желательно добавить дополнительные лекарственные средства к лекарственное средство-линкер части и, в конечном счете, к лиганду. Разветвляющаяся группа способна образовывать ковалентную связь с двумя-четырьмя параллельными соединительными звеньями, с двумя-четырьмя группами Присоединения лекарственного средства или с двумя-четырьмя -X-D группами. Таким образом, разветвляющаяся группа обеспечивает возможность присоединени нескольких

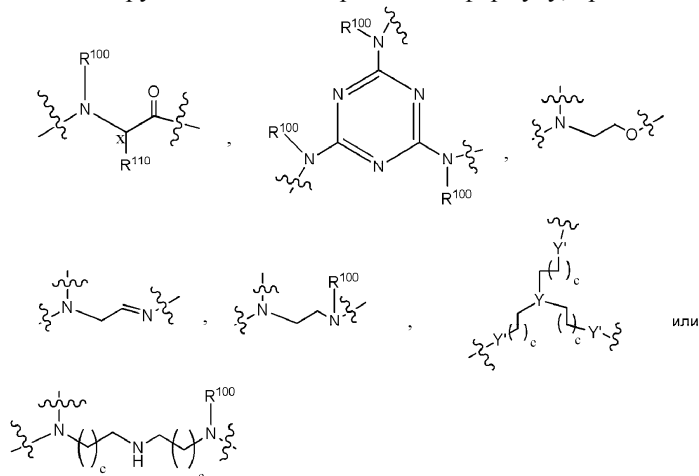


групп в структурах, таких как

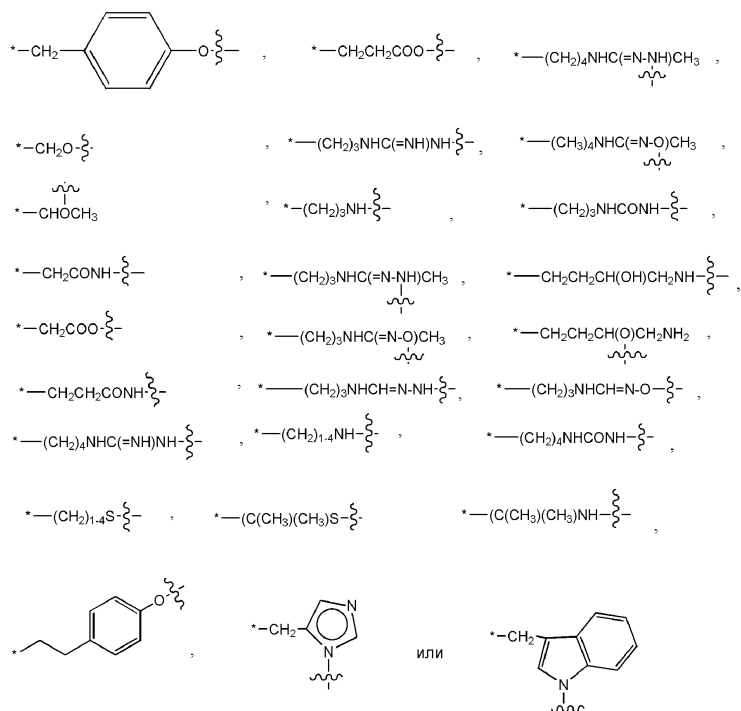


в случаях, когда m имеет значение больше чем 1. Специалистам в данной области должно быть понятно, что разветвляющаяся группа рассчитана таким образом, чтобы она обеспечивала возможность разветвления в линкере. Для того, чтобы действовать как разветвляющаяся группа, разветвляющаяся группа содержит по меньшей мере первый, второй и третий участок присоединения для присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединений. Иначе говоря, разветвляющаяся группа должна быть по меньшей мере трифункциональной. В вариантах осуществления, где m представляет собой 3 из 4, разветвляющаяся группа будет содержать четыре или пять участков для ковалентного присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединений. В некоторых аспектах разветвляющаяся группа представляет собой единую группу или содержит две или более субъединиц (например, от 2 до 10, предпочтительно от 2 до 5, например, 2, 3, 4 или 5) для обеспечения необходимого количества участков присоединения, где разветвляющаяся группа или ее субъединица независимо выбраны из природных или имеющих не-природное происхождение аминокислот, аминокспиртов, аминокальдегидов или полиаминов или их комбинаций. В случае необходимости, чтобы иметь нужное количество присоединений, по меньшей мере одна из аминокислот, аминокспиртов, аминокальдегидов или полиаминов будет содержать функционализированную боковую цепь для обеспечения участков присоединения для L^P группы и/или Z группы и/или AD групп и/или X-D групп. В некоторых аспектах одна или несколько аминокислот, аминокспиртов или аминокальдегидов должны иметь не-природное происхождение и должны быть модифицированы так, чтобы они содержали одну или несколько функционализированных боковых цепей для участков присоединения. Примеры функционализированных аминокислот, аминокспиртов или аминокальдегидов включают, например, азидо- или алкин-функционализированные аминокислоты, аминокспирты или аминокальдегиды (например, аминокислота, аминокспирт или аминокальдегид, модифицированные так, чтобы они содержали азидную группу или алкиновую группу для присоединения, с использованием клик-химии).

Каждая аминокислота, аминокспирт, аминокальдегид или полиамин могут быть природного или не-природного происхождения. Подобным образом, каждая аминокислота может представлять собой D- или L-изомер. В некоторых вариантах осуществления, где разветвляющаяся группа может соединять два параллельных соединительных звена, две X-D Группы или две группы присоединения лекарственного средства, такая разветвляющаяся группа после ее сборки имеет формулу, представленную ниже:



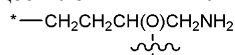
где волнистая линия указывает два или три из трех участков присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединений, и где R^{110} представляет собой



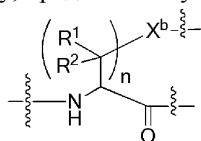
где звездочка указывает присоединение к углероду, помеченному символом x , и волнистая линия указывает один из трех участков присоединения разветвляющейся группы; каждый R^{100} независимо выбран из водорода или $-C_1-C_3$ алкила, предпочтительно из водорода или CH_3 ,

Y независимо выбран из N или CH ,
каждый Y^1 независимо выбран из NH , O или S ,
нижний индекс s независимо представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 3.

В предпочтительных вариантах осуществления R^{110} является отличным от



В некоторых вариантах осуществления, где разветвляющаяся группа способна связываться с двумя параллельными соединительными звеньями или двумя группами присоединения лекарственного средства, каждая разветвляющаяся группа в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях после ее сборки имеет формулу, представленную ниже



где нижний индекс n имеет значение от 1 до 4;

X^b выбран из группы, состоящей из $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-C(=O)-$ и $-S(=O)-$; и

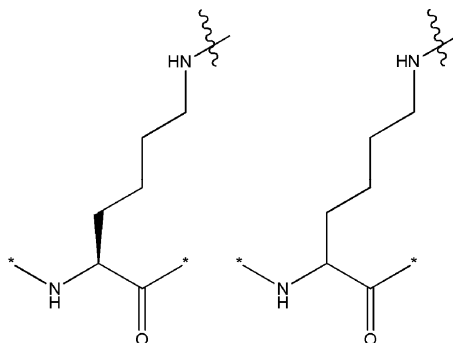
R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H , C_{1-3} алкила, фенила и C_2-C_5 гетероцикла (предпочтительно из H или C_{1-3} алкила), где волнистая линия указывает ковалентное присоединение разветвляющейся группы в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточном соединении.

Аминокислота, аминспирт, аминоальдегид или полиамин разветвляющейся группы необязательно могут быть замещены необязательно замещенным C_{1-20} гетероалкиленом (предпочтительно необязательно замещенным C_{1-12} гетероалкиленом), необязательно замещенным C_{3-8} гетероцикло, необязательно замещенным C_{6-14} ариленом или необязательно замещенным C_3-C_8 карбоцикло, как описано в настоящей заявке. Необязательно замещенный гетероалкилен, гетероцикл, арилен или карбоцикло должен содержать функциональные группы для присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях.

Необязательные заместители включают $(=O)$, $-X$, $-R$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-NRC(=O)R$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-AsO_2H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$ или $-C(=NR)NR_2$, где каждый X независимо представляет собой галоген: $-F$, $-Cl$, $-Br$ или $-I$; и каждый R независимо представляет собой $-H$, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_6-C_{20}$ арил, $-C_3-C_{14}$ гетероцикл, защитную группу или группу пролекарства.

Предпочтительные необязательные заместители представляют собой (=O), -X, -R, -OR, -SR и -NR₂.

Примером разветвляющейся группы является лизин, как показано ниже, где волнистая линия и звездочка указывают ковалентную связь в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях



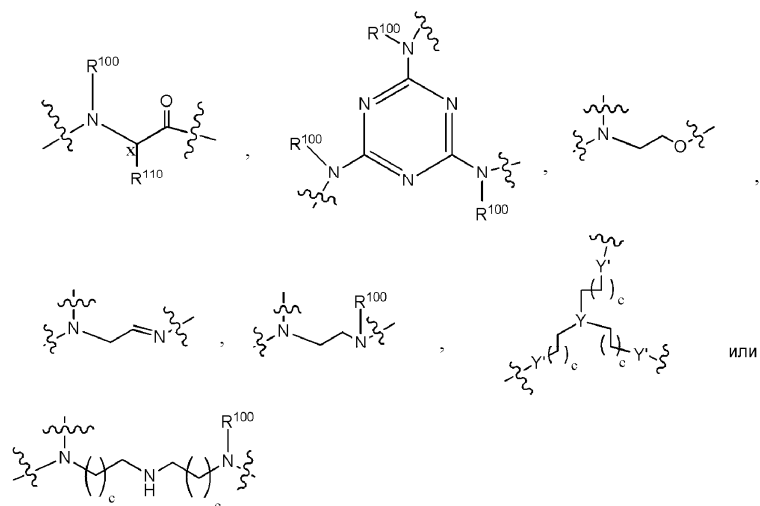
Должно быть понятно, что в формулах для некоторых из промежуточных соединений, представленных в настоящей заявке, необязательная разветвляющаяся группа способна образовывать от двух до четырех ковалентных присоединений к -X-D группам, но еще не присоединена к ним. В таких вариантах осуществления разветвляющаяся группа будет находиться в частично собранной форме и, как таковая, будет включать две или более реакционноспособных функциональных групп, которые могут взаимодействовать с группами, присутствующими в высвобождаемых комплексных группах -X-D частей конъюгата. Особенно предпочтительные реакционноспособные функциональные группы включают сульфгидрильные группы, способные образовывать дисульфидные связи, или тиоэфиры.

В предпочтительных аспектах настоящего изобретения разветвляющаяся группа имеет массу не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 500 д Да, не больше чем около 200 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 1000 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 500 Да, или от около 10, 50 или 100 Да до около 200 Да.

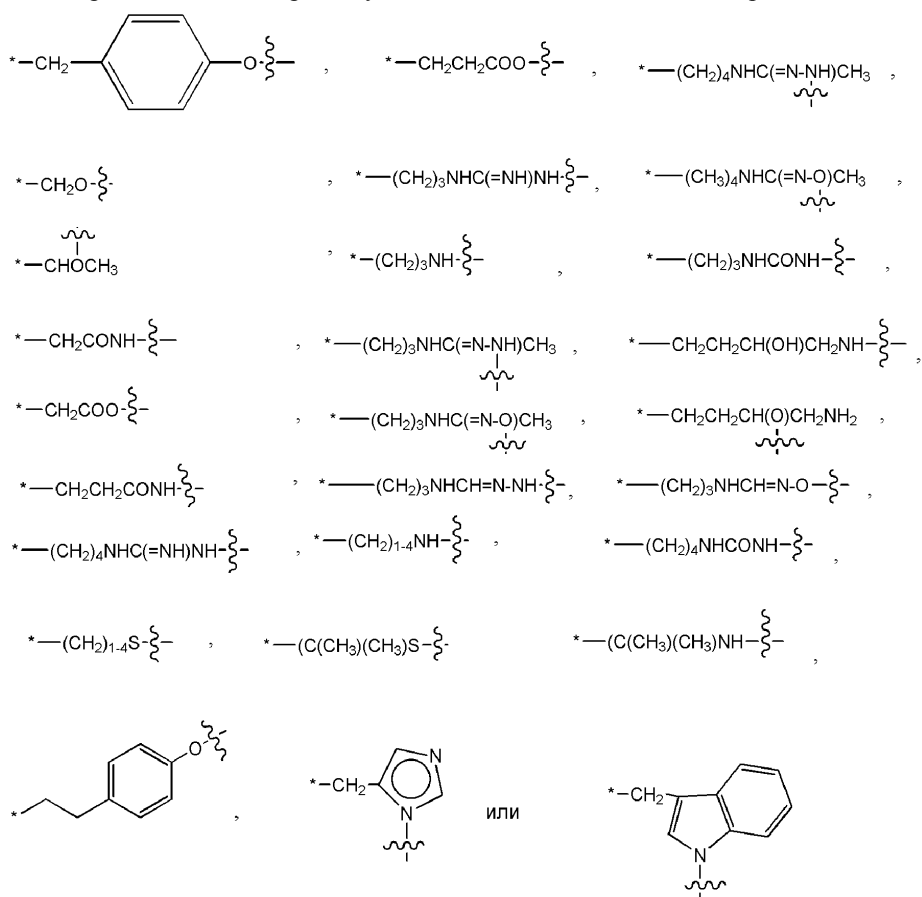
Группа присоединения лекарственного средства (AD)

Как и в случае разветвляющейся группы группу присоединения лекарственного средства включают в конъюгаты лиганд-лекарственное средство в случаях, когда желательно добавить дополнительные -X-D группы (т.е. высвобождаемую комплексную группу, ковалентно присоединенную к группе лекарственного средства) к лекарственное средство-линкер части и, в конечном счете, к лиганду. Группа присоединения лекарственного средства, в зависимости от размещения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, будет содержать либо два участка присоединения либо три участка присоединения для связывания с компонентами конъюгата лиганд-лекарственное средство или его промежуточными соединениями. Специалистам в данной области должно быть понятно, что группа присоединения лекарственного средства может представлять собой любую группу, которая служит для обеспечения присоединения дополнительной -X-D группы в лекарственное средство-линкер части и, в конечном счете, к группе лиганда. В некоторых вариантах осуществления каждая группа присоединения лекарственного средства представляет собой единую группу или содержит две или более субъединиц (например, от 2 до 10, предпочтительно от 2 до 5, например, 2, 3, 4 или 5), где группа присоединения лекарственного средства или ее субъединица независимо выбраны из природных или имеющих не-природное происхождение аминокислот, аминокспиртов, аминокальдегидов, диаминов или полиаминов или их комбинаций. Если необходимо, чтобы иметь необходимое количество присоединений, по меньшей мере одна из аминокислот, аминокспиртов, аминокальдегидов или полиаминов будет содержать функционализированную боковую цепь для обеспечения участков присоединения для L^P группы, и/или Z группы, и/или AD групп, и/или X-D групп. В некоторых аспектах, одна или несколько аминокислот, аминокспиртов или аминокальдегидов должны иметь не-природное происхождение и должны быть модифицированы так, чтобы они содержали одну или несколько функционализированных боковых цепей для участков присоединения к высвобождаемой комплексной группе. Примеры функционализированных аминокислот, аминокспиртов или аминокальдегидов включают, например, азидо- или алкин-функционализированные аминокислоты, аминокспирты или аминокальдегиды (например, аминокислота, аминокспирт или аминокальдегид, модифицированные так, чтобы они содержали азидную группу или алкиновую группу для присоединения, с использованием клик-химии).

В некоторых аспектах, когда AD группа содержит три участка присоединения, AD группа, в ее собранной форме, имеет формулу, представленную ниже:



где волнистая линия указывает два или три из трех AD участков присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях, и где R¹⁰⁰ представляет собой



где звездочка указывает присоединение к углероду, помеченному символом x, и волнистая линия указывает один из трех участков присоединения;

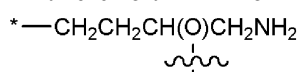
R¹⁰⁰ независимо выбран из водорода или -C₁-C₃ алкила, предпочтительно из водорода или CH₃,

Y независимо выбран из N или CH,

Y' независимо выбран из NH, O или S и

нижний индекс c независимо выбран из значений от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 3.

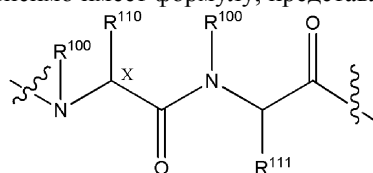
В предпочтительных аспектах, R¹⁰⁰ является отличным от



В вариантах осуществления, где AD группа содержит два участка присоединения (т.е. концевая AD группа) один из участков присоединения, показанных выше, может быть замещен, например, H, OH или C₁₋₃ незамещенной алкильной группой.

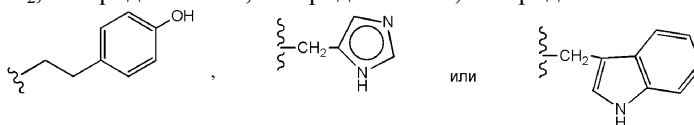
В некоторых вариантах осуществления, где AD группа содержит три участка присоединения, AD

группа, в ее собранной форме, независимо имеет формулу, представленную ниже

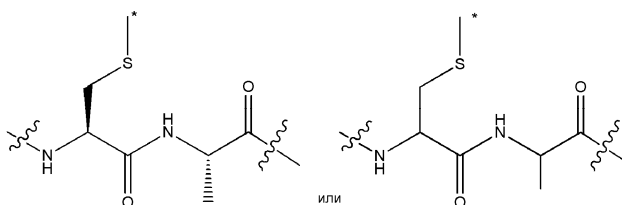


где волнистая линия указывает участки присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях и где x, R^{100} и R^{110} имеют значения, определенные непосредственно выше, и где

R^{111} представляет собой п-гидроксибензил, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-

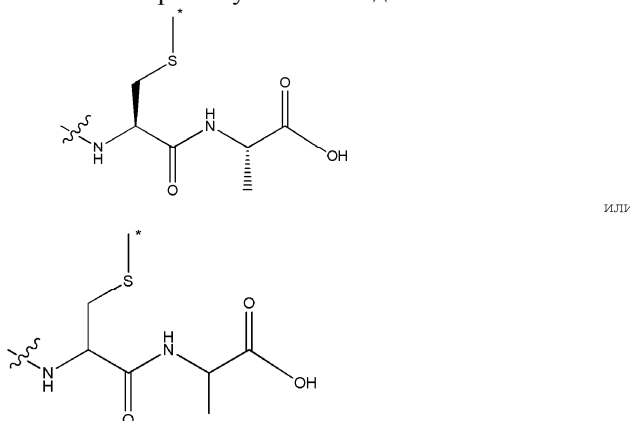


В некоторых вариантах осуществления, где AD группа содержит три участка присоединения, AD группа состоит из двух или более аминокислот. Примером такой аминокислотной AD группы является цистеин-аланин, как показано ниже, где волнистая линия и звездочка указывают присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях



В некоторых вариантах осуществления звездочка указывает ковалентное присоединение к высвобождаемой комплексной группе.

В некоторых вариантах осуществления, где AD группа содержит два участка присоединения, AD группа состоит из двух или более аминокислот. Примером такой аминокислотной AD группы является цистеин-аланин, как показано ниже, где волнистая линия и звездочка указывают присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях

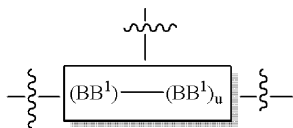


В некоторых вариантах осуществления звездочка указывает ковалентное присоединение к высвобождаемой комплексной группе.

Аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту, аминокислоту или полиамин AD группы необязательно можно заместить необязательно замещенным C_{1-20} гетероалкиленом (предпочтительно необязательно замещенным C_{1-12} гетероалкиленом), необязательно замещенным C_{3-8} гетероцикло, необязательно замещенным C_{6-14} ариленом или необязательно замещенным $\text{C}_3\text{-C}_8$ карбоцикло, как описано в настоящей заявке. Необязательно замещенный гетероалкилен, гетероцикл, арилен или карбоцикло должен содержать функциональные группы для присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях. Необязательные заместители включают $(=\text{O})$, $-\text{X}$, $-\text{R}$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NR}_3$, $=\text{NR}$, CX_3 , CN , OCN , SCN , $\text{N}=\text{C}=\text{O}$, NCS , NO , NO_2 , $=\text{N}_2$, N_3 , $\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$, SO_3^- , SO_3H , $\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, PO_3^- , PO_3H_2 , AsO_2H_2 , $\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $\text{C}(=\text{O})\text{X}$,

$C(=S)R$, CO_2R , CO_2- , $C(=S)OR$, $C(=O)SR$, $C(=S)SR$, $C(=O)NR_2$, $C(=S)NR_2$ или $C(=NR)NR_2$, где каждый X независимо представляет собой галоген: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R независимо представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₆-C₂₀ арил, -C₃-C₁₄ гетероцикл, защитную группу или группу пролекарства. Предпочтительные необязательные заместители представляют собой (=O), X, R, OR, SR и NR₂.

Группа присоединения лекарственного средства может быть линейной или разветвленной и может быть представлена формулой В



Формула В

Где BB^1 независимо выбран из аминокислоты, необязательно замещенного C₁₋₂₀ гетероалкилена (предпочтительно необязательно замещенного C₁₋₁₂ гетероалкилена), необязательно замещенного C₃₋₈ гетероцикло, необязательно замещенного C₆₋₁₄ арилена или необязательно замещенного C₃₋₈ карбоцикло;

и нижний индекс u независимо выбран из значений от 0 до 4; где волнистая линия указывает участки ковалентного присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточном соединении. Необязательно замещенный гетероалкилен, гетероцикл, арилен или карбоцикло должен содержать функциональные группы для связывания между ВВ субъединицами и в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае BB^1 представляет собой аминокислоту, чтобы группу можно было определить как аминогруппу присоединения лекарственного средства. Нижний индекс u может иметь значение 0, 1, 2, 3 или 4. В некоторых аспектах BB^1 представляет собой аминокислоту и имеет значение 0. В некоторых вариантах осуществления, AD Группа включает не больше чем 2 необязательно замещенных C₁₋₂₀ гетероалкилена, необязательно замещенных C₃₋₈ гетероцикло, необязательно замещенных C₆₋₁₄ арилена или необязательно замещенных C₃₋₈ карбоцикло. В некоторых вариантах осуществления, AD группа включает не больше чем 1 необязательно замещенный C₁₋₂₀ гетероалкилен, необязательно замещенный C₃₋₈ гетероцикло, необязательно замещенный C₆₋₁₄ арилен или необязательно замещенный C₃₋₈ карбоцикло. Необязательно замещенный гетероалкилен, гетероцикл, арилен или карбоцикло должен содержать функциональные группы для связывания между ВВ субъединицами и в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях

Аминокислота аминогруппы присоединения лекарственного средства может представлять собой альфа, бета или гамма аминокислоту и может быть природного или неприродного происхождения. Аминокислота может представлять собой D или L изомер. Связывание в аминогруппе присоединения лекарственного средства или с другими компонентами конъюгата (или линкера) можно осуществлять, например, через amino, карбокси или другие функциональные группы. Необязательно замещенный гетероалкилен должен содержать функциональные группы для присоединения в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточных соединениях. Способы независимой активации и взаимодействия функциональных групп хорошо известны в данной области.

В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, аминокислота группы присоединения лекарственного средства (включая аминогруппу присоединения лекарственного средства) может быть независимо выбрана из D или L изомера тиолсодержащей аминокислоты. Тиолсодержащая аминокислота может представлять собой, например, цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

В другом варианте осуществления аминокислота, которая составляет группу присоединения лекарственного средства (включая аминогруппу присоединения лекарственного средства) может быть независимо выбрана из группы, состоящей из L- или D-изомеров следующих аминокислот: аланин (включая β-аланин), аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, цистеин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин фенилаланин, лизин, лейцин, метионин, серин, тирозин, треонин, триптофан, пролин, орнитин, пеницилламин, В-аланин, аминоалкиновая кислота, аминокандиновая кислот, гетероцикло-карбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминоалкановая кислота и их производные.

Предпочтительные аминокислоты включают цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин и аланин.

Должно быть понятно, что в формулах для некоторых из соединений, описанных в настоящей заявке, таких как соединения, где группа присоединения лекарственного средства способна образовывать ковалентное присоединение к -X-D, но еще не связана с -X-D, группа присоединения лекарственного средства будет находиться в частично собранной форме и, как таковая, будет включать функциональную группу, которая способна взаимодействовать с группой, присутствующей в высвобождаемой комплексной группе. Особенно предпочтительные реакционноспособные функциональные группы включают сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей или тиоэфирных связей. В некоторых аспектах, реакционноспособный атом серы будет защищен защитной группой. Защитные группы тиолов

или их использование в химическом конъюгировании хорошо известны в данной области и включают, например, алкилтиольные (например, трет-бутилтиол, этантиол, 2-пропантиол, 2-пиридинетиол) защитные группы, ароматические тиольные защитные группы (например, 2-пиридинетиол) и ацетильные защитные группы.

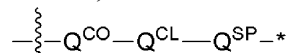
В предпочтительных аспектах настоящего изобретения группа присоединения лекарственного средства имеет массу не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 500 Да, не больше чем около 200 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 1000 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 500 Да, или от около 10, 50 или 100 Да до около 200 Да.

Высвобождаемая комплексная группа (X)

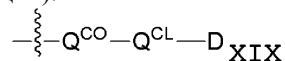
Высвобождаемая комплексная группа (-X-) связывает группу лекарственного средства с остальной частью конъюгата лиганд-лекарственное средство. Основной функцией высвобождаемой комплексной группы является высвобождение свободного лекарственного средства на участке, являющемся мишенью для лиганда. В этой связи высвобождаемая комплексная группа способна образовывать расщепляемую связь с группой лекарственного средства или содержит расщепляемую связь для высвобождения лекарственного средства (например, в результате антиген-опосредованной интернализации). В предпочтительных вариантах осуществления механизм высвобождения для высвобождаемой комплексной группы представляет собой ферментативный механизм высвобождения или механизм элиминирования дисульфида. Сайт распознавания для ферментативного механизма высвобождения может представлять собой, например, сайт пептидного расщепления или сайт расщепления сахара (например, глюкуронидный сайт расщепления).

Высвобождаемая комплексная группа может включать от 1 до 3 компонентов, расщепляемую группу (Q^{CL}), необязательную спейсерную группу (Q^{SP}) и необязательную группу ковалентного присоединения (Q^{CO}). Спейсерная группа, когда она присутствует, выполняет функцию связывания расщепляемой группы и группы лекарственного средства. Соответственно, в вариантах осуществления, где спейсерная группа присутствует, эта спейсерная группа будет непосредственно связана с группой лекарственного средства, и расщепляемая группа будет связана с группой лекарственного средства через спейсерную группу. В вариантах осуществления, где спейсерная группа отсутствует, расщепляемая группа будет непосредственно связана с группой лекарственного средства.

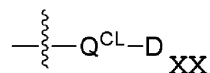
Соответственно, высвобождаемая комплексная группа может быть представлена формулой, показанной ниже, где Q^{CO} представляет собой группу ковалентного присоединения, Q^{SP} представляет собой спейсерную группу и Q^{CL} представляет собой расщепляемую группу. Группа ковалентного присоединения может присутствовать или отсутствовать и спейсерная группа может присутствовать или отсутствовать. Звездочка указывает участок ковалентного присоединения к группе лекарственного средства, и волнистая линия указывает ковалентное присоединение в конъюгате лиганд-лекарственное средство или его промежуточном соединении (к L^P , A или AD, в зависимости от ситуации):



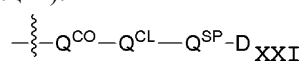
В вариантах осуществления, где спейсерная группа отсутствует и группа ковалентного присоединения присутствует, -X-D может быть представлен формулой XIX, где волнистая линия, прилегающая к группе ковалентного присоединения, указывает ковалентное присоединение к остальной части линкера (к L^P , A или AD, в зависимости от ситуации).



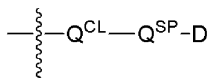
В вариантах осуществления, где группа ковалентного присоединения отсутствует и спейсерная группа отсутствует, -X-D может быть представлен формулой XX, где волнистая линия, прилегающая к расщепляемой группе, указывает ковалентное присоединение к остальной части линкера (к L^P , A или AD, в зависимости от ситуации):



В вариантах осуществления, где спейсерная группа присутствует и группа ковалентного присоединения присутствует, -X-D может быть представлен формулой XXI, где волнистая линия, прилегающая к группе ковалентного присоединения, указывает ковалентное присоединение к остальной части линкера (к L^P , A или AD, в зависимости от ситуации):



В вариантах осуществления, где спейсерная группа присутствует и группа ковалентного присоединения отсутствует, X-D может быть представлен формулой XXII, где волнистая линия, прилегающая к расщепляемой группе или спейсерной группе, указывает ковалентное присоединение к остальной части линкера (L^P , A или AD, в зависимости от ситуации).



XXII

Специалистам в данной области будет понятно, что любое из представленных выше определений для -X-D (формулы XIX-XXIV) можно использовать в любой из формул и вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и в любом из их особых вариантов осуществления. Каждый X, D и каждая Q^{CO}, Q^{CL} или Q^{SP} группа могут быть одинаковыми или отличными друг от друга.

В предпочтительных аспектах настоящего изобретения высвобождаемая комплексная группа имеет массу не больше чем около 5000 Да, не больше чем около 4000 Да, не больше чем около 3000 Да, не больше чем около 2000 Да, не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 800 Да или не больше чем около 500 Да. В некоторых аспектах высвобождаемая комплексная группа имеет массу от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 5000 Да, от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 4000 Да, от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 3000 Да, от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 2000 Да, от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 1000 Да, от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 800 Да, или от около 100 Да или от около 200 Да или от около 300 Да до около 500 Да.

Специалистам в данной области будет понятно, что компоненты промежуточных линкерных или лекарственное средство-линкер соединений могут быть связаны таким же образом, как конъюгаты лиганд-лекарственное средство без группы лиганда.

Расщепляемая группа (Q^{CL})

Расщепляемая группа является единственным компонентом высвобождаемой комплексной группы, который должен присутствовать. В некоторых аспектах расщепляемая группа образует расщепляемую связь с группой лекарственного средства. В некоторых аспектах расщепляемая группа образует расщепляемую связь со спейсерной группой. В некоторых аспектах расщепляемая связь находится в расщепляемой группе, но обеспечивает возможность высвобождения свободного лекарственного средства (например, посредством реакции 1,6-элиминирования после расщепления). Функциональные группы для образования расщепляемой связи могут включать, например, сульфгидрильные группы для образования дисульфидной связи, альдегидные, кетоновые или гидразиновые группы для образования гидразоновой связи, гидроксилминовые группы для образования оксимной связи, карбоксильные или амино группы для образования пептидных связей, карбоксильные или гидроксильные группы для образования сложноэфирной связи и сахара для образования гликозидной связи.

Природа расщепляемой группы может широко варьироваться. Например, расщепляемые линкеры включают дисульфидсодержащие линкеры, расщепляемые через дисульфидный обмен, кислотолабильные линкеры, расщепляемые при кислотном pH, и линкеры, расщепляемые гидролазами (например, пептидазами, эстеразами и глюкуроонидазами).

Структура и последовательность расщепляемой группы могут быть такими, чтобы группа расщеплялась под действием ферментов, присутствующих на сайте-мишени. В других аспектах расщепляемая группа может расщепляться другими механизмами. Расщепляемая группа может включать один или несколько сайтов расщепления.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа включает одну аминокислоту или одну или несколько последовательностей аминокислот. Расщепляемая группа может включать, например, монопептидную, дипептидную, трипептидную, тетрапептидную, пентапептидную, гексапептидную, гептапептидную, октапептидную, нонапептидную, декапептидную, ундекапептидную или додекапептидную группу.

Каждая аминокислота расщепляемой группы может представлять собой природную или имеющую не-природное происхождение аминокислоту и/или D- или L-изомер, при условии, конечно, что присутствует расщепляемая связь. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа включает только природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа включает от 1 до 12 аминокислот в смежной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота расщепляемой группы независимо выбрана из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цистеина, метионина, селеноцистеина, орнитина, пеницилламина, β-аланина, аминокановой кислоты, аминокановой кислоты, аминокандиновой кислоты, аминокановой кислоты, аминогетероцикло-алкановой кислоты, гетероцикло-карбоновой кислоты, цитруллина, статины, диаминоалкановой кислоты и их производных. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота независимо выбрана из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цистеина, метионина и селеноцистеина. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота независимо выбрана из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина,

пролина, триптофана и валина. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота выбрана из протеиногенных или непротеиногенных аминокислот.

В другом варианте осуществления каждая аминокислота расщепляемой группы независимо выбрана из группы, состоящей из следующих L-(природных) аминокислот: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан и валин.

В другом варианте осуществления каждая аминокислота расщепляемой группы независимо выбрана из группы, состоящей из D-изомеров этих природных аминокислот: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан и валин.

В некоторых вариантах осуществления связь между расщепляемой группой и группой лекарственного средства или спейсерной группой может ферментативно расщепляться под действием одного или нескольких ферментов, включая опухоль-ассоциированную протеазу, с высвобождением группы лекарственного средства (-D), которая в одном варианте осуществления подвергается *in vivo* протонированию при высвобождении с обеспечением лекарственного средства (D).

Полезные расщепляемые группы могут быть сконструированы и оптимизированы, что касается их селективности для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухоль-ассоциированной протеазой. В одном варианте осуществления связывание (или связь) между расщепляемой группой и группой лекарственного средства или спейсерной группой является таким, что расщепление этой связи катализируется катепсином В, С и D или протеазой плазмином.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа может включать только природные аминокислоты. В других вариантах осуществления расщепляемая группа может включать только не встречающиеся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа может включать природную аминокислоту, связанную с не встречающейся в природе аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа может включать природную аминокислоту, связанную с D-изомером природной аминокислоты.

Иллюстративная расщепляемая группа представляет собой дипептид -Val-Cit-, -Phe-Lys- или -Val-Ala.

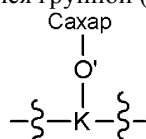
В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа включает пептид и включает от 1 до 12 аминокислот. В некоторых таких вариантах осуществления пептид конъюгируют непосредственно с группой лекарственного средства и спейсерная группа отсутствует. В некоторых таких вариантах осуществления пептид представляет собой дипептид.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа -CU- представлена как $(-AM-)_{1-12}$ или $(-AM-AM-)_{1-6}$, где AM в каждом случае независимо выбран из природных аминокислот или аминокислот неприродного происхождения. В одном аспекте AM в каждом случае независимо выбран из природных аминокислот. Специалистам в данной области будет понятно, что аминокислоты типично связаны с группой лекарственного средства или спейсерной группой через функциональные группы, присутствующие в аминокислоте, например ее карбоновокислотный или аминоконцы.

В других аспектах расщепляемая группа включает сайт расщепления сахара. В некоторых таких вариантах осуществления расщепляемая группа включает сахарный компонент (Su), связанный через кислородную гликозидную связь с саморасщепляющейся группой. В таких аспектах саморасщепляющаяся группа считается частью расщепляемой группы, Q^{CL} .

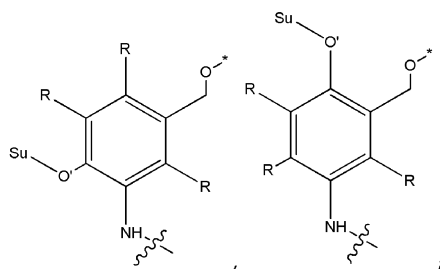
"Саморасщепляющаяся группа" представляет собой трифункциональную химическую группу, которая способна ковалентно связывать вместе три отстоящие друг от друга химические группы (т.е. группу сахара (через гликозидную связь), группу лекарственного средства (непосредственно или опосредованно через спейсерную группу Q^{SP}) и L^P группу, A Группу или AD Группу (непосредственно или опосредованно через группу ковалентного присоединения Q^{CO}). Гликозидная связь представляет собой такую, которая может расщепляться на сайте-мишени, инициируя последовательность реакций саморасщепления, которая приводит к высвобождению лекарственного средства.

Соответственно, расщепляемая группа может включать сахарный компонент (Su), связанный через гликозидную связь (-O'-) с саморасщепляющейся группой (K) формулы



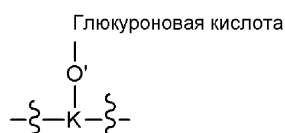
где саморасщепляющаяся группа K образует ковалентную связь с группой лекарственного средства (непосредственно или опосредованно через спейсерную группу) и ковалентную связь с L^P , AD или A (непосредственно или опосредованно через группу ковалентного присоединения), в зависимости от ситуации.

Расщепляемая группа может быть, например, представлена формулой



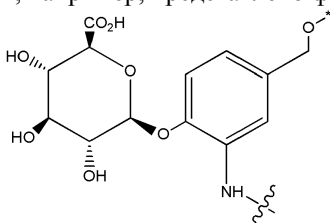
где Su представляет собой сахарный компонент, -O'-представляет собой кислородную гликозидную связь; каждый R независимо представляет собой водород, галоген, -CN или -NO₂; и где волнистая линия указывает присоединение к L^P, AD или A (либо непосредственно либо опосредованно через группу ковалентного присоединения), и звездочка указывает присоединение к группе лекарственного средства (либо непосредственно либо опосредованно через спейсерную группу, при этом спейсерная группа, когда она присутствует, может представлять собой, например, -C(=O)-).

В некоторых таких вариантах осуществления сайт расщепления сахара распознается бета-глюкуронидазой и расщепляемая группа включает глюкуронидное звено. Глюкуронидное звено может включать глюкуроновую кислоту, связанную через гликозидную связь (-O'-) с саморасщепляющейся группой (K) формулы



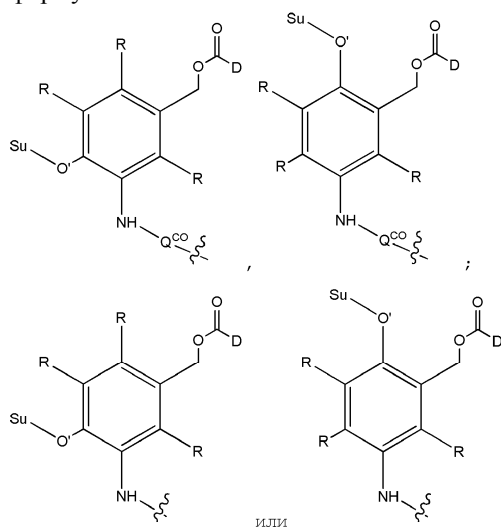
где саморасщепляющаяся группа K образует ковалентную связь с группой лекарственного средства (непосредственно или опосредованно через спейсерную группу) и ковалентную связь с L^P, AD или A (непосредственно или опосредованно через группу ковалентного присоединения), в зависимости от ситуации.

Глюкуронидное звено может быть, например, представлено формулой



где волнистая линия указывает ковалентное присоединение к L^P, AD или A (либо непосредственно либо опосредованно через группу ковалентного присоединения), и звездочка указывает ковалентное присоединение к группе лекарственного средства (либо непосредственно либо опосредованно через спейсерную группу).

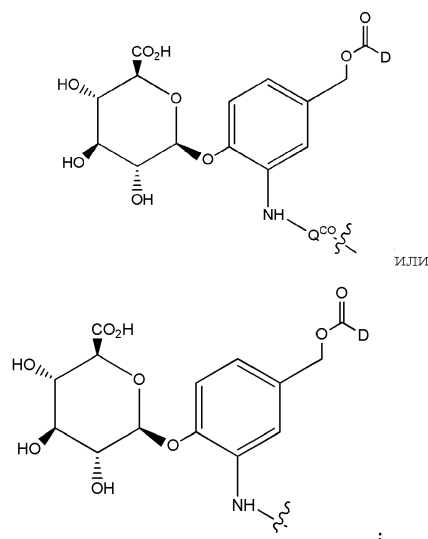
В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа включает сайт расщепления сахара, -X-D представлен следующей формулой:



где Su представляет собой Сахарный компонент, -O'-представляет собой кислородную гликозидную связь; каждый R независимо представляет собой водород или галогеновую, -CN, -NO₂ или другую электроакцепторную группу, Q^{CO} представляет собой Группу Ковалентного Присоединения; где волнистая

линия указывает ковалентное присоединение к остальной части линкерной группы (L^P , A или AD, в зависимости от ситуации).

Когда расщепляемая группа включает глюкуронидное звено, -X-D может быть, например, представлен следующей формулой:



где волнистая связь указывает ковалентное присоединение к остальной части линкерной группы (L^P , A или AD, в зависимости от ситуации); и Q^{CO} представляет собой группу ковалентного присоединения.

В некоторых других вариантах осуществления расщепляемая группа сама будет включать атом серы, который способен образовывать связь с атомом серы спейсерной группы или группы лекарственного средства с образованием дисульфида или пространственно затрудненного дисульфида. Расщепление происходит между двумя атомами серы дисульфида. В некоторых таких вариантах осуществления, один из атомов серы отщепляется от группы лекарственного средства и при условии отсутствия какого-либо другого механизма высвобождения другой атом серы остается присоединенным к группе лекарственного средства и становится частью группы лекарственного средства.

Самые разнообразные дисульфидные линкеры известны в данной области техники и могут быть адаптированы для использования в настоящем изобретении, включая, например, те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират), SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол) и SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат). (см., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также Патент США № 4880935.)

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа является pH-чувствительной и будет включать, например, кислотолабильный линкер, гидролизуемый в лизосоме (например, можно использовать группу гидразона, семикарбазона, тиосемикарбазона, амида цис-аконитовой кислоты, ортоэфира, ацетала или кетала). (См., например, Патенты США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14 653-14 661). Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, например, в крови, но они нестабильны при более низком pH 5,5 или 5,0, приблизительно в условиях pH лизосомы.

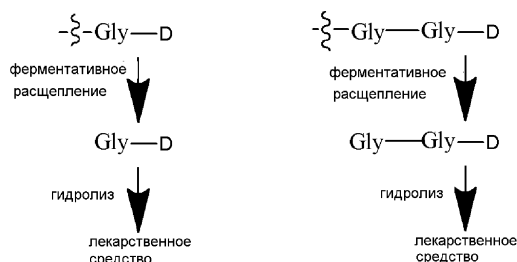
В некоторых вариантах осуществления расщепляемую группу можно конъюгировать непосредственно с группой лекарственного средства и расщепляемая группа может быть связана с группой лекарственного средства через расщепляемую пептидную или дисульфидную связь.

Спейсерная группа (Q^{SP})

Спейсерная группа, когда она присутствует, выполняет функцию связывания группы лекарственного средства с расщепляемой группой. Спейсерная группа бывает двух общих типов: саморасщепляющаяся и несаморасщепляющаяся. Несаморасщепляющаяся группа представляет собой такую, в которой часть или вся спейсерная группа остается связанной с группой лекарственного средства после расщепления и может либо далее распадаться, либо спонтанно разлагаться с обеспечением "свободного лекарственного средства", или сама может стать частью группы лекарственного средства. Примеры несаморасщепляющейся группы включают, но не ограничиваются этим, глицин-глицин группу и группу, включающую один глицин (обе показаны на схеме A) (ниже). Когда конъюгат лиганд-лекарственное средство, содержащий глицин-глицин группу или включающую один глицин группу, подвергается ферментативному расщеплению через ассоциированную с опухолевыми клетками протеазу, ассоциированную с раковыми клетками протеазу или лимфоцит-ассоциированную протеазу, группа глицин-глицин-

лекарственное средство или группа глицин-лекарственное средство отщепляется от конъюгата. В одном варианте осуществления независимая реакция гидролиза происходит в клетке-мишени, расщепляя связь глицин-группа лекарственного средства и высвобождая лекарственное средство.

Схема А

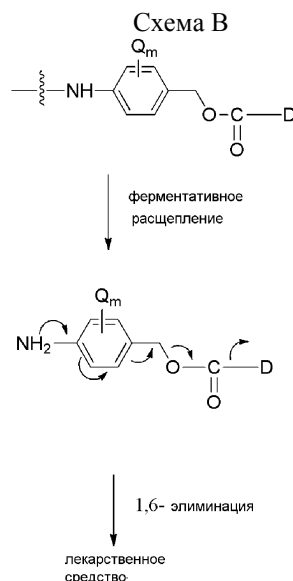


В одном варианте осуществления несаморасщепляющаяся группа представляет собой -Gly-Gly-. В другом варианте осуществления несаморасщепляющаяся группа представляет собой -Gly-.

В другом варианте осуществления Спейсерная Группа включает группу п-аминобензилового спирта (РАВ) (см. Схемы В и С, ниже), где фениленовая часть замещена группой Q_m , где Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-O-(C_1-C_8$ алкил) или другую электронодонорную группу, или -галоген-, нитро-, циано или другую электроноакцепторную группу и m представляет собой целое число, имеющее значение от 0-4.

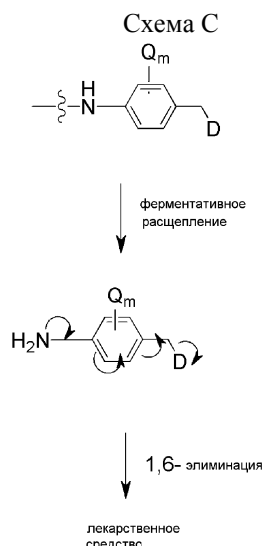
Альтернативно, конъюгат, содержащий саморасщепляющуюся Спейсерную группу, может высвобождать -D без необходимости в отдельной стадии гидролиза. В некоторых аспектах расширяющая группа включает РАВ группу, которая связана с пептидной расщепляемой группой через атом азота амино РАВ группы и соединяется непосредственно с группой лекарственного средства через карбонатную, карбаматную или эфирную группу. РАВ группа и смежный карбонил составляют спейсерную группу. Не привязывая это к какой-либо конкретной теории или механизму, схема В показывает возможный механизм высвобождения лекарственного средства РАВ группы, которая присоединена непосредственно к -D через карбаматную или карбонатную группу, эта идея поддерживается Toki et al, 2002, J Org. Chem. 67:1866-1872.

Схема В



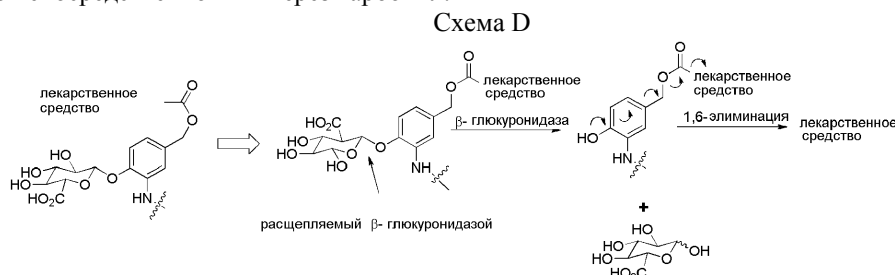
где Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-O-(C_1-C_8$ алкил), галоген, -нитро или -циано и m представляет собой целое число, имеющее значение от 0-4.

Не привязывая это к какой-либо конкретной теории или механизму, схема С показывает возможный механизм высвобождения лекарственного средства РАВ группы, которая присоединена непосредственно к -D через эфирную или аминую связь.



где Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-O-$ (C_1-C_8 алкил), галоген, $-$ нитро или $-$ циано и m представляет собой целое число, имеющее значение 0-4.

Не привязывая это к какой-либо конкретной теории или механизму, схема D показывает возможный механизм высвобождения лекарственного средства РАВ группы глюкуронового звена, которое присоединено непосредственно к -D через карбонил.



Другие примеры саморасщепляющихся групп включают ароматические соединения, которые с электронной точки зрения аналогичны РАВ группе, такие как 2-аминоимдазол-5-метанольные производные (см., например, Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто или пара-аминобензилацетали. Можно использовать спейсеры, которые подвергаются циклизации в результате гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (см., например, Rodriguez et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (см., например, Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (см., например, Amsberg et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Элиминирование амин-содержащих лекарственных средств, которые замещены в α-положении глицина (см., например, Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447), также является примером саморасщепляющегося спейсера, полезного в иллюстративных Конъюгатах.

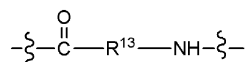
В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения спейсерная группа состоит из 1, 2 или 3 саморасщепляющихся или не-саморасщепляющихся групп.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения спейсерная группа имеет массу не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 500 Д, не больше чем около 400 Да, не больше чем около 300 Да или от около 10, 50 или 100 до около 1000 Да, от около 10, 50 или 100 до около 500 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 400 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 300 Да или от около 10, 50 или 100 Да до около 200 Да.

Группа ковалентного присоединения (Q^{CO})

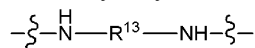
Группа ковалентного присоединения, когда она присутствует, расширяет рамки высвобождаемой линкерной комплексной группы для обеспечения большего расстояния между L^P и группой лекарственного средства. В этой связи группа ковалентного присоединения содержит функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой необязательной разветвляющейся группы А или L^P или группы присоединения лекарственного средства AD на одном конце, и функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой расщепляемой группы на других концах. В некоторых аспектах иллюстративными являются связи посредством неусловно-расщепляемых связей.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что группа ковалентного присоединения может представлять собой любую группу или компонент, который служит для обеспечения присоединения расщепляемой группы к остальной части молекулы. В некоторых аспектах группа ковалентного при-



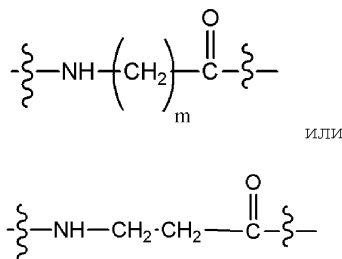
где R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен, -C₃-C₈ карбоцикло, -арилен, -C₁-C₁₀ гетероалкилен, -C₃-C₈ гетероцикло, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен. В предпочтительных вариантах осуществления R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен.

Репрезентативная группа ковалентного присоединения, содержащая NH группу для связывания с расщепляемой группой, представляет собой следующую:



где R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен-, -C₃-C₈ карбоцикло, -арилен, -C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈ гетероцикло, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-. В предпочтительных вариантах осуществления R¹³ представляет собой -C₁-C₆ алкилен.

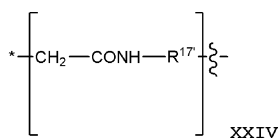
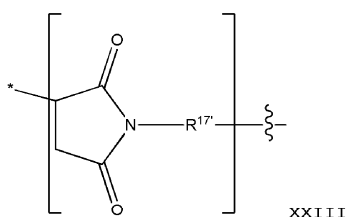
Отдельные варианты осуществления групп ковалентного присоединения включают следующие, где волнистая линия, прилегающая к азоту, указывают ковалентное присоединение к L^P (или AD или A), и волнистая линия, прилегающая к карбонилу, указывает ковалентное присоединение к расщепляемой группе и m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4.



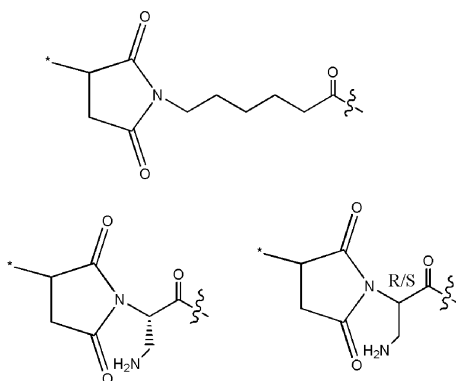
В некоторых аспектах группа ковалентного присоединения представляет собой необязательно замещенный C₁₋₈ гетероалкилен.

В некоторых аспектах, особенно тех, где группа ковалентного присоединения образует связь с атомом серы параллельного соединительного звена, разветвляющейся группы или группы присоединения лекарственного средства, группа ковалентного присоединения будет образовывать связь с этим атомом серы через малеимидную группу группы ковалентного присоединения.

Репрезентативные группы ковалентного присоединения этого варианта осуществления включают группы в квадратных скобках формул XXIII и XXIV, где волнистая линия указывает присоединение к расщепляемой группе, определенной в настоящей заявке, и звездочка указывает присоединение к атому серы параллельного соединительного звена, разветвляющейся группы или группы присоединения лекарственного средства, и R¹⁷ представляет собой -C₁-C₁₀ алкилен-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈ карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкил), -арилен, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₃-C₈ гетероцикло, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло), -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-C(=O)-, -C₃-C₈ карбоцикло-C(=O)-, -O-(C₁-C₈ алкил)-C(=O)-, -арилен-C(=O), -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-C(=O)-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-C(=O), -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₃-C₈ гетероцикло-C(=O), -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-C(=O)-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-NH-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-NH-, -C₃-C₈ карбоцикло-NH-, -O-(C₁-C₈ алкил)-NH-, -арилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-NH-, арилен-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-NH-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₃-C₈ гетероцикло-NH-, C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-NH-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-NH-, -C₁-C₁₀ алкилен-S-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-S-, -C₃-C₈ карбоцикло-S-, -O-(C₁-C₈ алкил)-S-, -арилен-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-S-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ карбоцикло)-S-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-S-, -C₃-C₈ гетероцикло-S-, -C₁-C₁₀ алкилен-(C₃-C₈ гетероцикло)-S- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-S-. Заместители R¹⁷ могут быть необязательно замещенными. В некоторых аспектах, R¹⁷ заместители являются незамещенными. В некоторых аспектах, R¹⁷ группы необязательно замещены щелочной группой, например, -(CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где x представляет собой целое число, имеющее значение 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ гелогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы.



Иллюстративной группой ковалентного присоединения является группа формулы XXIII, где R¹⁷ представляет собой -C₂-C₅ алкилен-C(=O)-, где алкилен необязательно замещен щелочной группой, например, -(CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где x представляет собой целое число, имеющее значение 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы. Иллюстративные варианты осуществления представляют собой следующие:



Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид, показанный выше, может существовать в гидратированной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи).

Должно быть понятно, что аминогруппа расширяющей группы может быть защищена аминозащитной группой, например, кислотолabileй защитной группой (например, BOC).

В предпочтительных аспектах настоящего изобретения группа ковалентного присоединения имеет массу не больше чем около 1000 Да, не больше чем около 500 Да, не больше чем около 400 Да, не больше чем около 300 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 500 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 500 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 400 Да, от около 10, 50 или 100 Да до около 300 Да, или от около 10, 50 или 100 Да до около 200 Да.

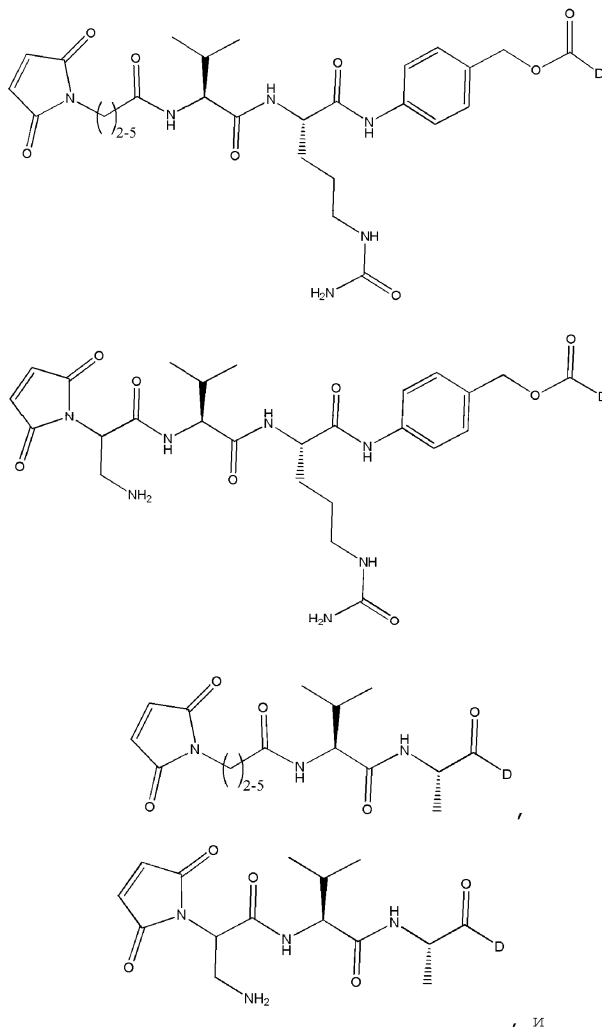
Пегелированные каркасы для конъюгации

Как должно быть понятно специалистам в данной области, размер ПЭГ группы, выбираемой для использования в настоящем изобретении, будет зависеть от гидрофобности лекарственного и линкерного компонентов группы лекарственное средство-линкер до присоединения к ней ПЭГ группы. Промежуточные соединения формул DD, X, XI или XII могут действовать как пегелированные каркасы для конъюгации, которые можно использовать для скрининга комбинаций лекарственных средств и ПЭГ групп, которые обеспечивают получение ADC, имеющих улучшенные фармакокинетические параметры и/или минимальную агрегацию. Пегелированные каркасы для конъюгации обеспечивают платформу для оптимизации количества ПЭГ субъединиц для данного лекарственного средство-линкер соединения.

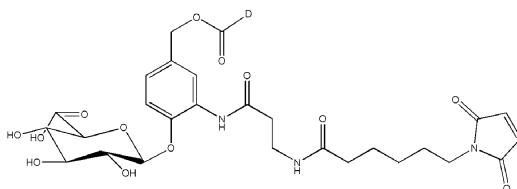
Пегелированные каркасы для конъюгации специфически сконструированы для обеспечения возможности параллельной конъюгации различных групп лекарственного средства и ПЭГ для исследования способности ПЭГ маскировать гидрофобность и улучшать фармакокинетические параметры для широкого ряда традиционных лекарственных средств-линкеров (т.е. лекарственные средства-линкеры, которые не содержат параллельно присоединенную ПЭГ группу в соответствии с настоящим изобретением). Предпочтительно нужно выбрать ПЭГ группу достаточного размера, которая будет маскировать гидрофобность лекарственного средства-линкера, но не будет слишком большой, чтобы оказывать негативное влияние на способность конъюгата лиганд-лекарственное средство диффундировать к целевому участку или проникать в клетки-мишени и высвобождать лекарственное средство.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления традиционные лекарственные средства-

линкеры, которые можно использовать для оптимизации ПЭГ, представляют собой такие, которые содержат реакционноспособную группу для конъюгации с тиольной группой антитела, например малеимидо-содержащие лекарственные средства-линкеры и высвобождаемую комплексную группу X, расщепляемую протеазой. Соответственно, примеры X-D групп, содержащих высвобождаемую комплексную группу X, расщепляемую протеазой, для использования с каркасными структурами для конъюгации включают следующие, где d представляет собой любую Группу Лекарственного Средства, описанную в настоящей заявке:

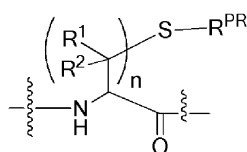


В других особенно предпочтительных вариантах осуществления, традиционные лекарственные средства-линкеры, которые можно использовать для оптимизации ПЭГ, представляют собой такие, которые содержат реакционноспособную группу для конъюгации с тиольной группой антитела, например малеимидо-содержащие лекарственные средства-линкеры, и высвобождаемую комплексную группу X, расщепляемую гликозидазой. Соответственно, примеры X-D групп, содержащих высвобождаемую комплексную группу X, расщепляемую гликозидазой, для использования с каркасными структурами для конъюгации включают следующие, где D представляет собой любую группу лекарственного средства, описанную в настоящей заявке



В вариантах осуществления, где лекарственные средства-линкеры, которые можно использовать для оптимизации ПЭГ, представляют собой такие, которые содержат реакционноспособную группу для конъюгации с тиол-акцепторной группой, такой как малеимидная группа, каркасная структура для конъюгации будет содержать защищенный тиолсодержащий остаток, который, когда он незащищен, способен к ковалентному присоединению к тиол-акцепторной группе лекарственного средства-линкера. Защищенный тиолсодержащий остаток может представлять собой компонент параллельного соединительного звена (или разветвляющейся группы или группы присоединения лекарственного средства).

Иллюстративный пегилированный каркас для конъюгации имеет формулу DD, где L^{PR} группа включает аминокислоту, имеющую следующую формулу:

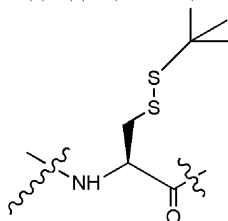


где нижний индекс n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4;

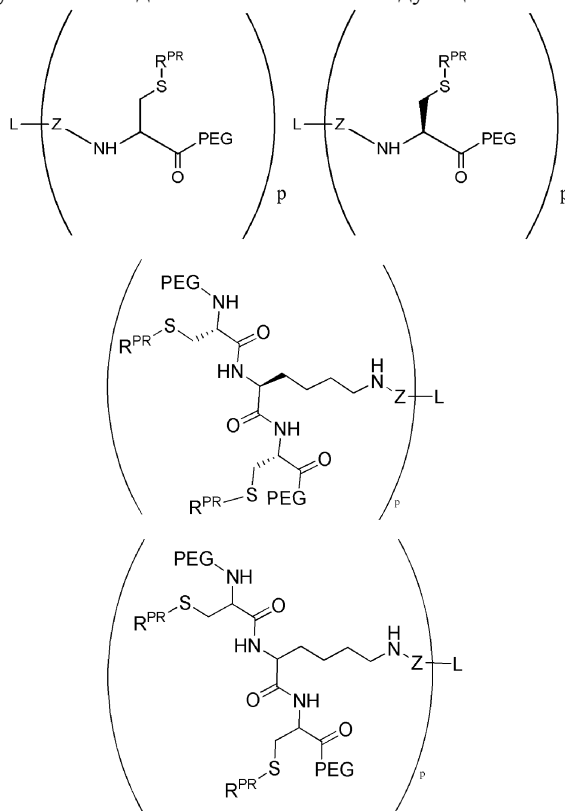
R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-3} алкила, фенила или C_2-C_5 гетероцикла (предпочтительно из водорода, метила, этила или пропила); и

R^{PR} представляет собой подходящую тиолзащитную группу.

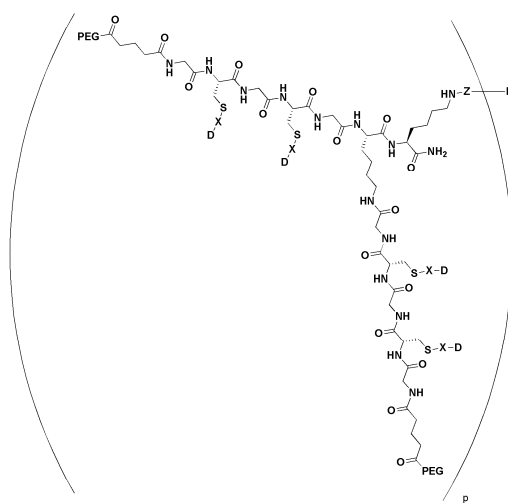
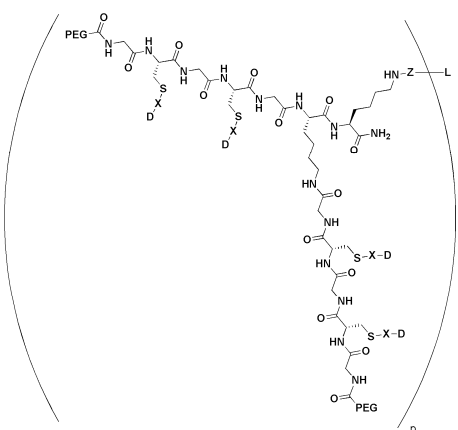
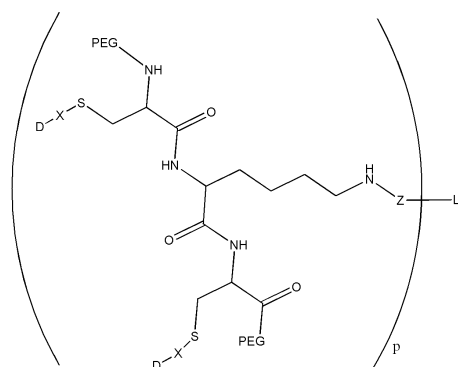
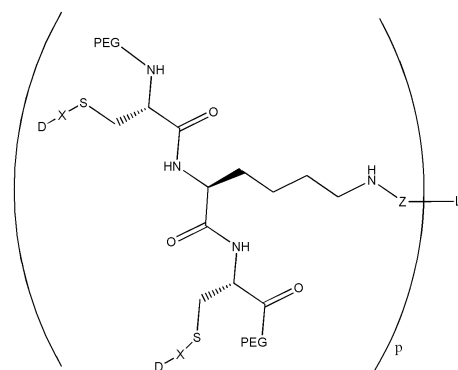
Иллюстративный пегилированный каркас для конъюгации имеет формулу DD, где L^{PR} группа включает защищенный цистеин, гомоцистеин или пеницилламин. D или L изомеры аминокислот являются подходящими. Примером аминокислоты для использования в качестве L^{PR} группы является цистеин, как показано ниже, с трет-бутилтио в качестве подходящей защитной группы.



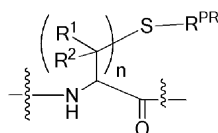
Иллюстративные пегилированные каркасы для конъюгации в соответствующим образом защищенном лиганд-линкер промежуточном соединении включают следующие:



Другие иллюстративные пегилированные каркасы для конъюгации в соответствующим образом защищенном лиганд-линкер промежуточном соединении включают следующие:



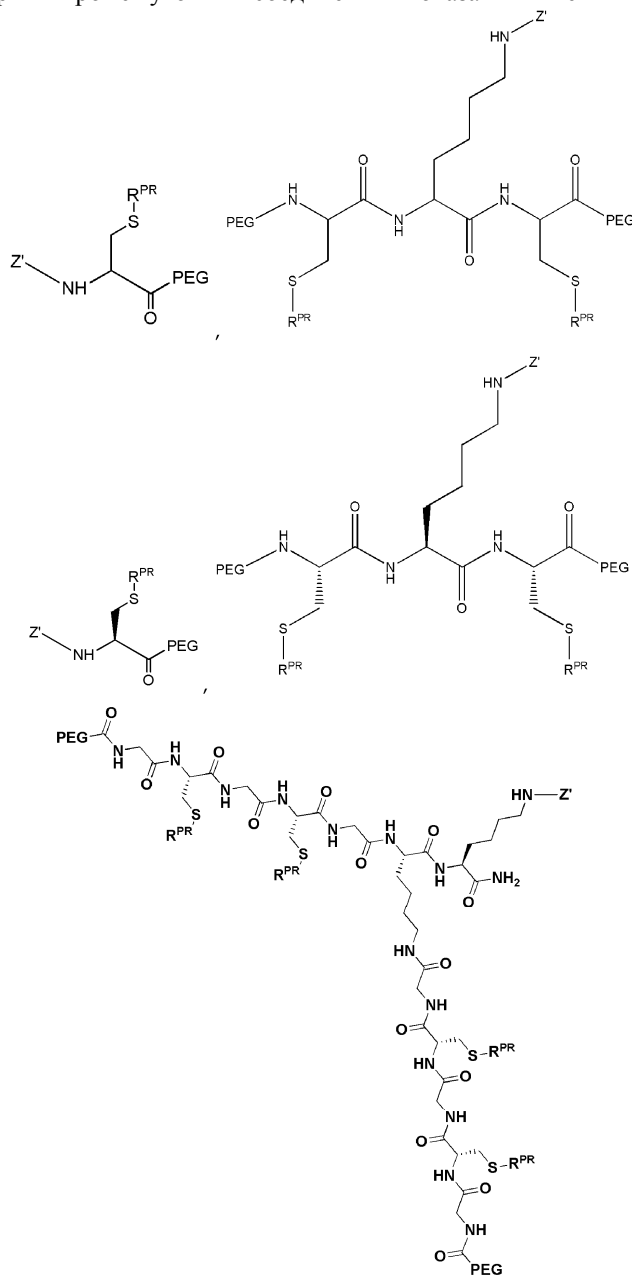
Иллюстративные промежуточные каркасы для конъюгации имеют формулу (CC), где L^P группа включает аминокислоту, имеющую следующую формулу:



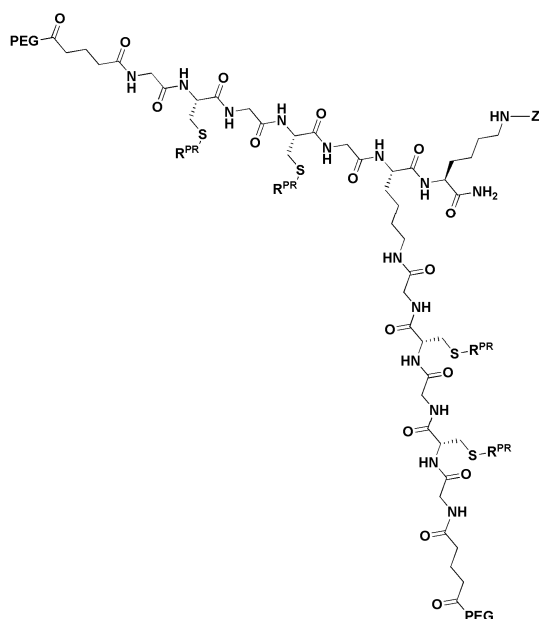
где нижний индекс n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4;
 R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-3} алкила, фенила или C_2-C_5 гетероцикла
(предпочтительно из водорода, метила, этила или пропила); и

R^{PR} представляет собой подходящую тиол-защитную группу.

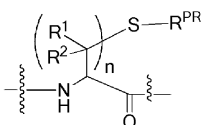
Иллюстративные промежуточные пегилированные каркасы конъюгатов в соответствующем образе защищенных линкерных промежуточных соединениях показаны ниже



и



Иллюстративный пегилированный каркас конъюгата может иметь формулу XI, где $L^{P'}$ группа и группа присоединения лекарственного средства AD' каждая включает независимо выбранную аминокислоту, имеющую следующую формулу:

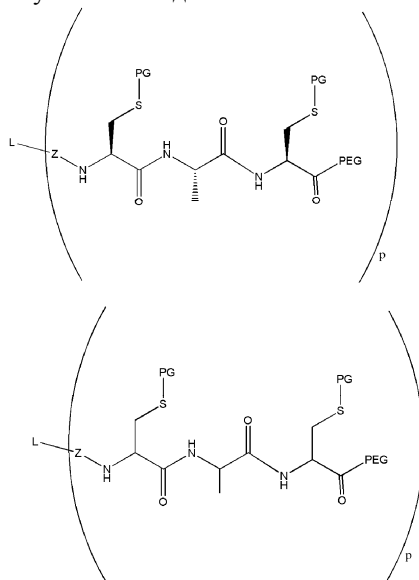


где нижний индекс n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 4;

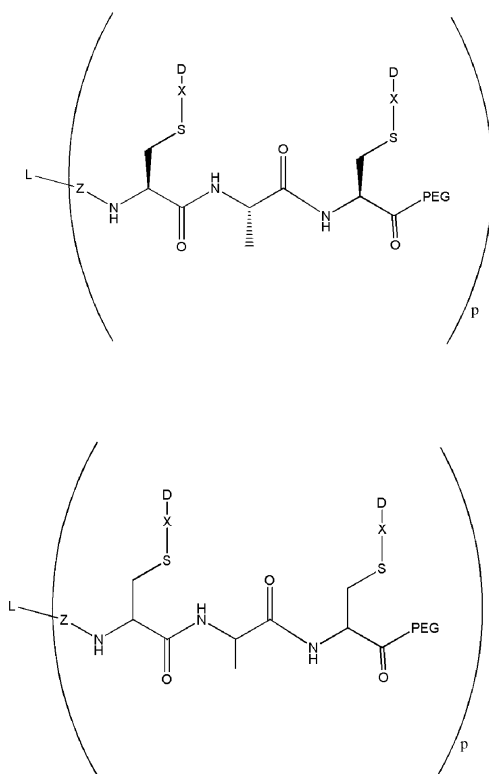
R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_{1-3} -алкила, фенила или C_2-C_5 гетероцикла (предпочтительно из водорода, метила, этила или пропила); и

R^{PR} представляет собой подходящую тиол-защитную группу.

Иллюстративные пегилированные каркасы конъюгатов формулы XI в соответствующем образом защищенном лиганд-линкер промежуточном соединении показаны ниже



Иллюстративные пегилированные каркасы для конъюгации после конъюгации с лекарственными средствами-линкерами обеспечивают конъюгаты лиганд-лекарственное средство Формулы II



Для пегилированных каркасов для конъюгации и промежуточных соединений расширяющая группа, Z или Z', ПЭГ, лиганд, защитная группа R^{PR} и нижний индекс p имеют значения, описанные в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке. В иллюстративных аспектах расширяющая группа представляет собой малеимидосодержащую расширяющую группу, описанную выше. В иллюстративных вариантах осуществления, ПЭГ группа содержит от 6 до 72, от 10 до 72 или от 12 до 72 субъединиц, и расширяющая группа представляет собой малеимидосодержащую расширяющую группу, описанную выше и в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке для XVa.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способы выбора ПЭГ Группы для использования в конъюгате лиганд-лекарственное средство, которые включают стадии (i) обеспечения каркаса для конъюгации, имеющего формулу (DD), где параллельное соединительное звено включает тиол-защищенный цистеин, (ii) удаления защитной группы из тиол-защищенного цистеина с образованием незащищенного каркаса для конъюгации, содержащего свободный тиол, (iii) контактирование незащищенного каркаса для конъюгации с лекарственным средством-линкером, содержащим функциональную группу для ковалентного связывания со свободным тиолом в условиях для образования конъюгата лиганд-лекарственное средство. Способы могут дополнительно включать испытание фармакокинетических параметров полученного конъюгата лиганд-лекарственное средство (см., например, пример 8 или 21). Также обеспечиваются конъюгаты лиганда с лекарственным средством, полученные такими способами.

Также обеспечиваются способы выбора ПЭГ группы для использования в конъюгате лиганд-лекарственное средство, которые включают стадии (i) обеспечения каркаса для конъюгации, имеющего формулу XI или XII, где параллельное соединительное звено и группа(группы) присоединения лекарственного средства включают тиолзащищенный цистеин, (ii) удаления защитной группы из тиол-защищенного цистеина с образованием незащищенного каркаса для конъюгации, содержащего свободный тиол, (iii) контактирование незащищенного каркаса для конъюгации с лекарственным средством-линкером, содержащим функциональную группу для ковалентного связывания со свободным тиолом в условиях для образования конъюгата лиганд-лекарственное средство. Способы могут дополнительно включать испытание фармакокинетических параметров полученного конъюгата лиганд-лекарственное средство (см., например, пример 21). Также обеспечиваются конъюгаты лиганда с лекарственным средством, полученные такими способами.

Нагрузка лекарственным средством

Как правило, для конъюгатов лиганд-лекарственное средство формул I, II, III и AA количество лекарственное средство-линкер групп на лиганд указывается символом p. Когда это относится к индивидуальным конъюгатам лиганд-лекарственное средство в популяции таких конъюгатов, p представляет собой целое число, представляющее количество молекул лекарственное средство-линкер на лиганд. Когда это относится к композиции, содержащей несколько конъюгатов (т.е. LDC композиция), p представляет собой среднее количество лекарственных средств-линкеров на лиганд и более типично не является целым числом. В тех случаях в экспериментальной части, описывающих LDC композиции, состоящие из

конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADCs), где указывается нагрузка лекарственным средством как определенное количество групп лекарственного средства/антитело (например, 8 нагрузок, 16 нагрузок или 32 нагрузки), это значение относится к средней нагрузке лекарственным средством, а также к нагрузке лекарственным средством преобладающего ADC в композиции, которая зависит от количества реакционноспособных участков на антителе, которые будут взаимодействовать с соединением линкер-лекарственное средство или, в случае целесообразности, с промежуточным лигандом, с последующим введением -X-D. В популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство, в среднем может быть от 1 до 14 лекарственное средство-линкер групп на лиганд, в среднем от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 6 до около 10, от около 8 до около 14, от около 8 до около 12 или от около 8 до около 10 лекарственное средство-линкер групп на лиганд. В качестве примера присоединения к лиганду можно указать присоединение через тиоэфирные связи. Примерами участков конъюгации на лиганде являются тиол межцепевых дисульфидных остатков и/или остатки, встроенные в лиганд, такие как встроенные цистеины. Когда это относится к вариантам осуществления, где средняя нагрузка лекарственным средством составляет около 8, 10, 12, 14, 16 или 32, значение 8, 10, 12, 14, 16 или 32 типично также относится к нагрузке лекарственным средством преобладающего конъюгата лиганда с лекарственным средством в композиции. Подобным образом, когда это относится к вариантам осуществления, где в среднем присутствуют от около 8 до около 14, от около 8 до около 12, или от около 8 до около 10 лекарственное средство-линкер групп на лиганд, это значение также типично относится к лекарственное средство-линкер нагрузке в преобладающем ADC в композиции.

Среднее количество групп лекарственное средство-линкер на группу лиганда в препарате, получаемом в результате реакции конъюгации, можно определить традиционными методами, такими как масс-спектрометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC) и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство, указываемое индексом p . В некоторых случаях разделение, очистку и характеризацию гомогенных конъюгатов лиганд-лекарственное средство, где p представляет собой определенное значение от конъюгата лиганд-лекарственное средство с другими нагрузками лекарственным средством, можно осуществить такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

Композиции

Настоящее изобретение обеспечивает композиции, включающие любой из конъюгатов лиганд-лекарственное средство, описанных в настоящей заявке. Например, настоящее изобретение обеспечивает композиции, включающие конъюгат лиганд-лекарственное средство формул AA, I, II или III, и любого из их особых вариантов осуществления. Переменные имеют значения, определенные в настоящей заявке в любом из вариантов осуществления.

Когда формулы AA, I, II или III представляют не отдельные LDC соединения, а LDC композицию (т.е. композицию, включающую популяцию конъюгатов лиганд-лекарственное средство), нижний индекс p представляет собой среднее количество молекул лекарственное средство-линкер на молекулу Лиганда (например, молекулу антитела) в композиции. Подобным образом, когда формулы DD, X, XI и XII представляют не индивидуальные лиганд-линкер промежуточные соединения, а композицию лиганд-линкер промежуточных соединений (т.е. композицию, включающую популяцию лиганд-линкер промежуточных соединений), нижний индекс p представляет собой среднее количество молекул линкера на молекулу лиганда (например, антитела) в композиции. Должно быть понятно, что композиции могут включать множество (или популяцию) конъюгатов лиганд-лекарственное средство, содержащих разные количества групп лекарственное средство-линкер, присоединенных к ним (например, от 1 до 14, от 2 до 12, от 4 до 12, от 6 до 12, от 8 до 12), для выхода на среднее p значение. Альтернативно, композиция может включать множество (или популяцию) конъюгатов лиганд-лекарственное средство, содержащих одинаковое или по существу по существу одинаковое количество лекарственных средств-линкеров, присоединенных к ним (от 1 до 14), для выхода на среднее p значение. Термины множество или популяция используются синонимично в этом контексте. В композиции может быть небольшой процент неконъюгированного антитела, что также отражено в среднем p значении. Для композиции, включающей популяцию конъюгатов лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению, может быть в среднем от 1 до 14 групп лекарственное средство-линкер на лиганд, в среднем от около 6 до около 14, от около 6 до около 12, от около 6 до около 10, от около 8 до около 14, от около 8 до около 12, или от около 8 до около 10 групп лекарственное средство-линкер на лиганд. Использование ПЭГ, как раскрывается в настоящем изобретении, является особенно подходящим для конъюгатов лиганд-лекарственное средство, имеющих высокие нагрузки лекарственными средствами, например, со средней нагрузкой лекарственным средством по меньшей мере около 6, более предпочтительно по меньшей мере около 8 групп лекарственное средство-линкер на лиганд, где каждая группа лекарственное средство-линкер содержит один или несколько -X-D компонентов, предпочтительно 1, 2 или 4. Соответственно, композиции, представленные в настоящей заявке, предпочтительно будут иметь среднюю нагрузку лекарственным средством-линкером по меньшей мере около 8 молекул лекарственное средство-линкер на лиганд в композиции, и предпочтительно содержат около 8, 10, 12 или 16 до около 32 групп лекарственного средства на группу лиганда.

В некоторых аспектах, композиции представляют собой фармацевтические композиции, включающие конъюгаты лиганд-лекарственное средство, описанные в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. Например, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, включающие конъюгат формулы I, II или III и любого из их особых вариантов осуществления. В некоторых аспектах, фармацевтическая композиция будет в жидкой форме. В некоторых аспектах, она будет представлять собой лиофилизированный порошок.

Композиции, включая фармацевтические композиции, могут быть представлены в очищенной форме. В контексте настоящего изобретения, "очищенный" означает, что, будучи выделенным, изолят содержит по меньшей мере 95% и, в другом аспекте, по меньшей мере 98% конъюгата в расчете на массу изолята.

Фармакокинетика

Как указано выше, авторы настоящего изобретения обнаружили, что фармакокинетический профиль некоторых конъюгатов лиганд-лекарственное средство можно существенным образом изменить путем добавления ПЭГ группы. В некоторых случаях, размещение ПЭГ в параллельной ориентации с группой лиганда и группой лекарственного средства снижает плазменный клиренс конъюгата лиганд-лекарственное средство и повышает содержание вещества в плазме, что улучшает желаемую фармакологическую активность таких конъюгатов. К удивлению, размещение ПЭГ группы в последовательной ориентации с группой лиганда и группой лекарственного средства не обеспечивает такого улучшения фармакокинетических эффектов и в некоторых случаях фактически повышает клиренс и снижает относительное содержание в плазме по сравнению с непегилированным аналогом. До настоящего изобретения, когда предпринимались попытки уменьшить гидрофобность через пегилирование гидрофобного соединения, эффекты ориентации ПЭГ группы не принимались во внимание.

Существует много путей для измерения фармакокинетических параметров конъюгата лиганд-лекарственное средство. Один способ включает определение концентрации конъюгата лиганд-лекарственное средство, т.е. количества конъюгата лиганд-лекарственное средство в данном объеме плазмы или сыворотки в определенной точке времени. Другой способ включает определение скорости выведения лекарственного средства из организма, т.е. объем плазмы (или сыворотки), очищенный от конъюгата лиганд-лекарственное средство, на единицу времени. Третий способ включает определение площади под кривой (AUC), т.е. интеграла кривой концентрация-время. Концентрацию, клиренс и AUC можно определить путем нанесения на график концентрации в сыворотке (или плазме) суммарного антигена (мкг/мл) по оси ординат (Y-ось) против времени (дни) по оси абсцисс (X-ось) после введения представляющего интерес средства, субъекту. Например, в одном способе, фармакокинетические параметры измеряют путем введения мышам при помощи инъекции дозы (i) неконъюгированного лиганда, (ii) конъюгата лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению и (iii) сравнительного конъюгата лиганд-лекарственное средство и сбора образцов крови в разных точках времени после инъекции (например, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 и 56 дней) и отделения сыворотки. Концентрацию в сыворотке (или плазме) можно измерить способами, известными в данной области техники. Например, концентрацию в сыворотке (или плазме) можно измерить "сэндвич"-методом ELISA для определения общего количества лиганда (например, антигена) с использованием подходящего механизма детекции. Показатели концентрации в сыворотке (или плазме) для каждого животного можно проанализировать с использованием соответствующей программы с получением значений концентрации, скорости выведения лекарственного средства и AUC в определенных точках времени. В другом варианте осуществления, фармакокинетические данные можно получить с использованием радиомеченых конъюгатов. Например, животным можно ввести радиомеченый лиганд или конъюгат лиганд-лекарственное средство и измерить концентрацию в плазме (или сыворотке) методом жидкостного сцинтилляционного счета. В некоторых вариантах осуществления, используемая животная модель представляет собой крысиную модель.

В некоторых вариантах осуществления фармакокинетический профиль конъюгата Лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению напоминает профиль его неконъюгированного лиганда. Соответственно, в настоящей заявке представлены конъюгаты лиганд-лекарственное средство, имеющие значение клиренса в пределах примерно 3-х или в пределах примерно 2-х значения клиренса неконъюгированного лиганда, и/или значение AUC, равное по меньшей мере 25% или по меньшей мере 30% от значения AUC неконъюгированного лиганда (например, см. табл. 2).

В некоторых вариантах осуществления, фармакокинетический профиль конъюгата лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению улучшается по сравнению со сравнительным конъюгатом. Соответственно, в настоящей заявке представлены конъюгаты лиганд-лекарственное средство, имеющие более лучшее значение концентрации, значение клиренса и/или значение AUC по сравнению со сравнительным конъюгатом (т.е. не содержащим ПЭГ группу в параллельной ориентации к группе лекарственное средство-линкер). Под термином более лучшее значение клиренса, подразумевается, что конъюгат лиганд-лекарственное средство имеет клиренс, который по меньшей мере 2-х или по меньшей мере 3-х лучше, чем значение клиренса сравнительного Конъюгата (например, значение 14,2 мл/день/кг по сравнению со значением 48,6 или 57,8 мл/день/кг). Под термином более лучшее значение AUC, подразумевается, что Конъюгат Лиганд-Лекарственное средство имеет значение AUC, которое по меньшей

мере 2х или по меньшей мере 3х лучше, чем значение AUC сравнительного конъюгата (например, значение 229,7 день*мкг/мл по сравнению со значением 67 или 52 день*мкг/мл).

Сравнительный конъюгат может представлять собой такой же или по существу такой же конъюгат, не содержащий ПЭГ группу, такой же или по существу такой же конъюгат, не содержащий ПЭГ группу, находящуюся в параллельной ориентации, но содержащий ПЭГ группу, находящуюся в последовательной ориентации по отношению к группе лиганда и группе лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, сравнительный конъюгат представляет собой конъюгат, включающий такую же группу лекарственного средства и либо не содержащий ПЭГ группу вообще (т.е. такой же или по существу такой же конъюгат без ПЭГ группы), либо содержащий ПЭГ группу, которая находится в последовательной ориентации по отношению к группе лиганда и группе лекарственного средства (т.е. такой же или по существу такой же конъюгат, содержащий ПЭГ группу, но которая не находится в параллельной ориентации). Как правило, конъюгат лиганд-лекарственное средство и сравнительный конъюгат имеют одинаковую нагрузку лекарственным средством (среднее количество групп лекарственного вещества на группу лиганда в композиции).

В контексте настоящего изобретения, фраза "такой же или по существу такой же конъюгат, не содержащий ПЭГ группу", как правило, относится к конъюгату, включающему такую же или по существу такую же группу лиганда, группу лекарственного средства и линкерную группу (например, расширяющую группу и высвобождаемую комплексную группу), но не содержащему параллельное соединительное звено L^P и ПЭГ группу. Что касается сравнительного конъюгата, не содержащего ПЭГ группу, который имеет наиболее близкое сходство с конъюгатом лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению, сравнительный конъюгат должен включать такую же группу лиганда, группу лекарственного средства, высвобождаемую комплексную группу, расширяющую группу и параллельное соединительное звено (и AD или A группу, в случае необходимости). Параллельное соединительное звено, однако, не будет присоединено к ПЭГ группе, но будет заканчиваться функциональной группой, такой как, например, ацетильная группа (см., например, соединение 44 в примерах)

В контексте настоящего изобретения, фраза "такой же или по существу такой же конъюгат, не содержащий ПЭГ группу, находящуюся в параллельной ориентации, но содержащий ПЭГ группу, которая находится в последовательной ориентации по отношению к группе лиганда и группе лекарственного средства" (т.е. такой же или по существу такой же конъюгат, содержащий ПЭГ группу, но которая не находится в параллельной ориентации), как правило, относится к конъюгату, включающему такую же или по существу такую же группу лиганда, группу лекарственного средства и линкерную группу (например, расширяющую группу и высвобождаемую комплексную группу), но не содержащему параллельное соединительное звено L^P и ПЭГ группу, присоединенную к нему в параллельной конфигурации, и включающему ПЭГ группу в линкере в последовательной ориентации с группой лиганда и группой лекарственного средства.

Термин "по существу такой же" в этом контексте означает, что могут быть незначительные изменения, но такие изменения имеют место главным образом для упрощения химического синтеза и присоединения различных компонентов конъюгата. Примеры сравнительных конъюгатов, не содержащих ПЭГ или содержащих ПЭГ группу в последовательной ориентации, в сравнении с конъюгатом по настоящему изобретению, содержащим ПЭГ группу в параллельной ориентации см. в разделе Примеры.

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство, которые демонстрируют значительно больший плазменный клиренс и соответственно более низкое содержание вещества в плазме по сравнению с неконъюгированным лигандом, будут полезными для настоящего изобретения, поскольку их можно модифицировать, как описано в настоящей заявке для включения ПЭГ группы. Существенно больший плазменный клиренс по сравнению с неконъюгированным Лигандом относится к значению клиренса, которое больше чем 2х, больше чем 3х или больше чем 4х значения плазменного клиренса для неконъюгированного Лиганда (см., например, табл. 2). Более низкое содержание вещества в плазме по сравнению с неконъюгированным Лигандом относится к значению AUC, которое составляет 30% или меньше, 25% или меньше или 20% или меньше от AUC неконъюгированного Лиганда (см., например, табл. 2).

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются конъюгаты лиганд-лекарственное средство, имеющие значение клиренса в пределах примерно 3х или в пределах примерно 2х значений клиренса неконъюгированного Лиганда, и/или значение AUC равное по меньшей мере 25% или по меньшей мере 30% от значения AUC неконъюгированного Лиганда.

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, которое можно использовать в качестве группы лекарственного средства в настоящем изобретении, представляет собой такое, которое при конъюгировании с лигандом в виде конъюгата лиганда с лекарственным средством, не содержащего ПЭГ или содержащего ПЭГ в последовательной ориентации, дает конъюгат лиганд-лекарственное средство, который демонстрирует существенно больший плазменный клиренс и соответственно более низкое содержание вещества в плазме крови по сравнению с неконъюгированным лигандом. Существенно больший плазменный клиренс по сравнению с неконъюгированным Лигандом относится к значению клиренса, которое больше чем 2х, больше чем 3х или больше чем 4х значения плазменного клиренса для неконъюгированного лиганда (см., например, табл. 2). Более низкое содержание вещества в плазме крови

по сравнению с обеспечиваемым неконъюгированным Лигандом относится к значению AUC, которое составляет 30% или меньше, 25% или меньше или 20% или меньше от AUC неконъюгированного лиганда (см., например, табл. 2).

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство, содержащие гидрофобную группу лекарственного средства или гидрофобные группы лекарственного средство-линкер, будут полезны для настоящего изобретения, поскольку их можно модифицировать, как описано в настоящей заявке, чтобы они включали ПЭГ группу, и можно видеть улучшение их фармакокинетических параметров при применении настоящего изобретения.

В предпочтительных вариантах осуществления, лиганд представляет собой антитело.

Агрегация

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что агрегацию некоторых Конъюгатов Лиганд-Лекарственное Средство можно существенно уменьшить путем добавления ПЭГ группы в параллельной ориентации относительно гидрофобной группы лекарственного средство-линкер.

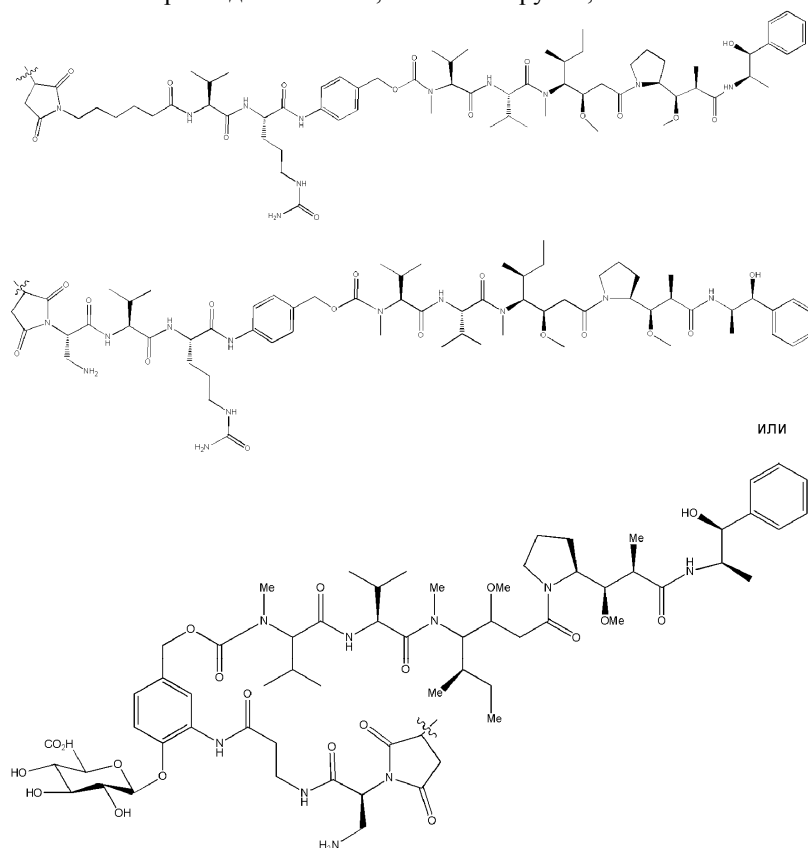
В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, которое можно использовать в настоящем изобретении, представляет собой такое, которое при конъюгировании с лигандом в виде конъюгата лиганда с лекарственным средством, не содержащего ПЭГ или содержащего ПЭГ в последовательной ориентации и содержащего в среднем 4, 8 или 16 групп лекарственного вещества на лиганд, дает конъюгат лиганд-лекарственное средство, который имеет уровни агрегации, измеренные при помощи SEC, 4% или больше, 5% или больше или 10% или больше.

Настоящее изобретение обеспечивает популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство, содержащие в среднем 8 групп лекарственного вещества на группу лиганда или больше, 10 групп лекарственного вещества на антитело или больше, 12 групп лекарственного вещества на антитело или больше, 16 групп лекарственного вещества на антитело или больше, или 32 групп лекарственного вещества на антитело, имеющие уровень агрегации около 1% или около 2% или около 3% (например, формула I или II, где r имеет значение 4 или 8, m имеет значение 1, s имеет значение ноль, и t имеет значение ноль; формула II, где r имеет значение 8, m имеет значение 2, s имеет значение 1, и t имеет значение ноль)

В предпочтительных аспектах, группа лиганда представляет собой антитело.

Специальные варианты осуществления

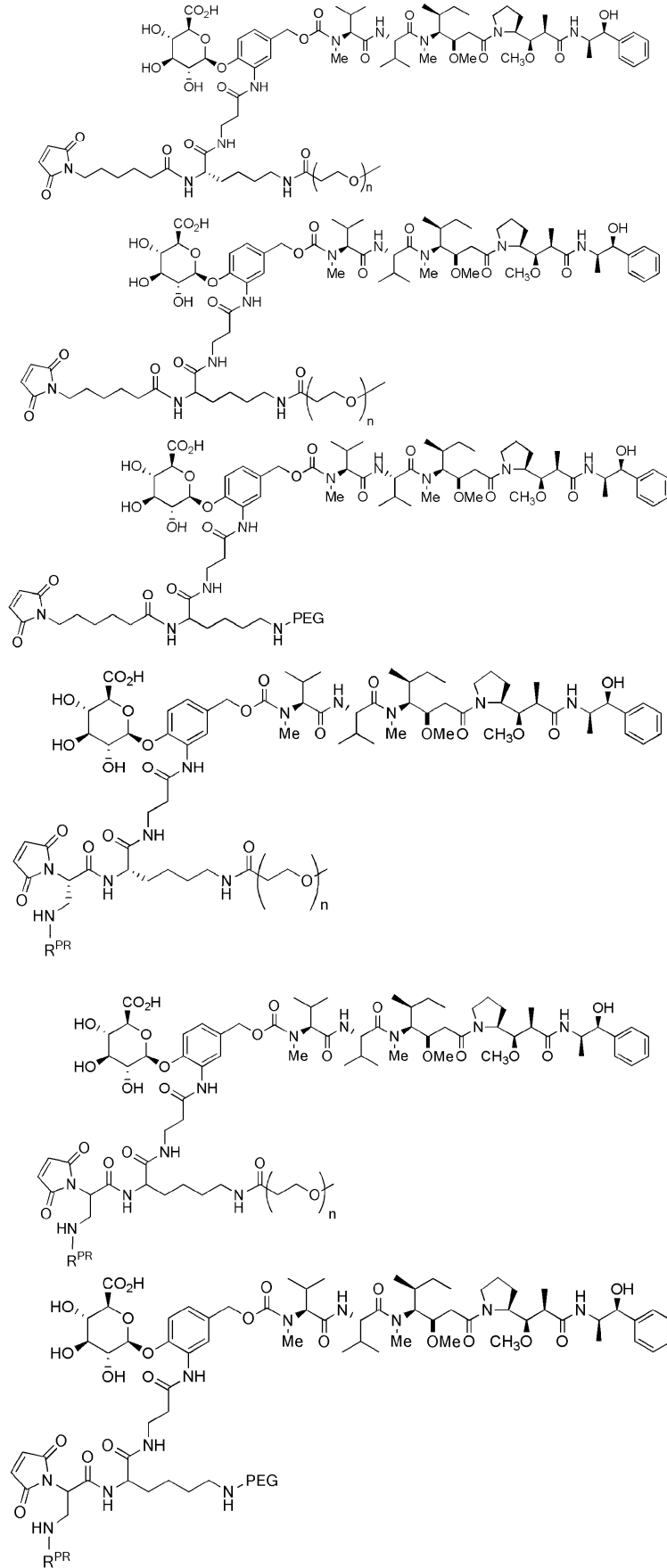
Иллюстративные -X-D группы по настоящему изобретению включают следующие, где волнистая линия указывает ковалентное присоединение к L^P , A или AD группе, в зависимости от ситуации



Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид, показанный выше, может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи).

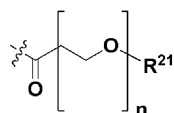
Примеры соединений лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению включают со-

единения, представленные следующими структурами:



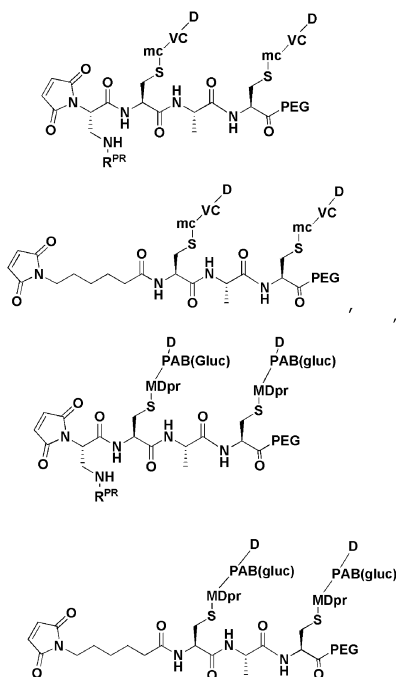
или фармацевтически приемлемую соль такого соединения, где ПЭГ группа имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и может быть дисперсной или не-дисперсной, и n представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 72, от 8 до

72, от 10 до 72, от 12 до 72, от 12 до 38, от 12 до 36, 6 до 24, или наиболее предпочтительно от 8 до 24 или от 12 до 24; R^{PR} представляет собой водород или защитную группу, например, кислотолabileную защитную группу, например, BOC. В некоторых вариантах осуществления, n имеет значение 8, 10, 12 или 24. Для популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство (т.е. LDC композиции), полученных с использованием дисперсного предшественника ПЭГ группы, который предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу пика, соответствующую ПЭГ группе, содержащей от около 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72, от 12 до 38, от 12 до 36, от 6 до 24, или наиболее предпочтительно от 8 до около 24 субъединиц, или от около 12 до около 38 субъединиц. Когда ПЭГ является недисперсным, тогда каждый LDC из LDC композиции типично будет содержать ПЭГ группу, которая имеет такое же количество ПЭГ субъединиц ($-OCH_2CH_2-$), т.е. такое же целое значение n . Не-дисперсная ПЭГ группа может, например, иметь структуру



где R^{21} представляет собой ПЭГ-блокирующую группу, предпочтительно $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$, и n представляет собой целое число, имеющее значение от 8 до 12, от 8 до 24 или от 12 до 38.

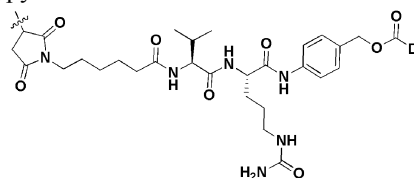
Иллюстративные соединения лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению, которые обеспечивают 2X нагрузку лекарственным средством, включают соединения, представленные следующими структурами:



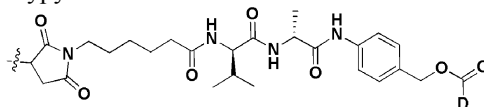
и теми структурами, в которых $mc-VC-PAB-D$ замещают $mc-VA-PAB-D$ или $mc-VA-D$ или любой другой X-D группой;

где R^{PR} представляет собой водород или защитную группу, например, кислотолabileную защитную группу, например, BOC;

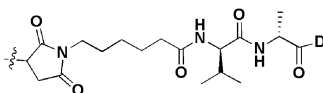
$mc-VC-PAB-D$ имеет структуру



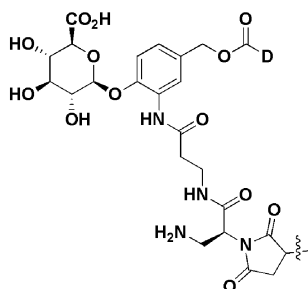
$mc-VA-PAB-D$ имеет структуру



$mc-VA-D$ имеет структуру

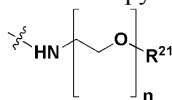


и MDpr-PAB(gluc)-D имеет структуру



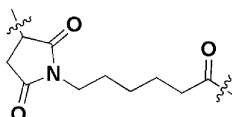
где mc-VC-PAB-D, mc-VA-PAB-D, mc-VA-D и MDpr-PAB(gluc)-D представляют собой иллюстративные -X-D группы, связанные с пегилированным каркасом, и где волнистая линия указывает ковалентную связывание сукцинимидного кольца mc или MDpr с атомом серы пегилированного каркаса;

и ПЭГ имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и может быть дисперсным при описании популяции LDCs, полученных с использованием дисперсного предшественника ПЭГ группы, где дисперсный предшественник ПЭГ группы предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу пика, соответствующую ПЭГ группе, имеющей p от около 8 до около 24 субъединиц или от около 12 до около 38 субъединиц, или является не-дисперсным (как определяют по ПЭГ группе, имеющей целочисленное значение p , где каждый LDC из LDC композиции будет содержать ПЭГ группу, которая имеет такое же целочисленное значение p). В некоторых вариантах осуществления не-дисперсная ПЭГ группа имеет структуру

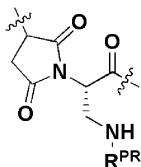


где R^{21} представляет собой ПЭГ-блокирующую группу, предпочтительно $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$, волнистая линия указывает ковалентное связывание ПЭГ группы с пегилированным каркасом, и p представляет собой целое число, имеющее значение от 8 до 24 или от 12 до 38.

В некоторых вариантах осуществления, mc группу в mc-VC-PAB-D, mc-VA-D и mc-VA-PAB-D, где mc группа имеет структуру



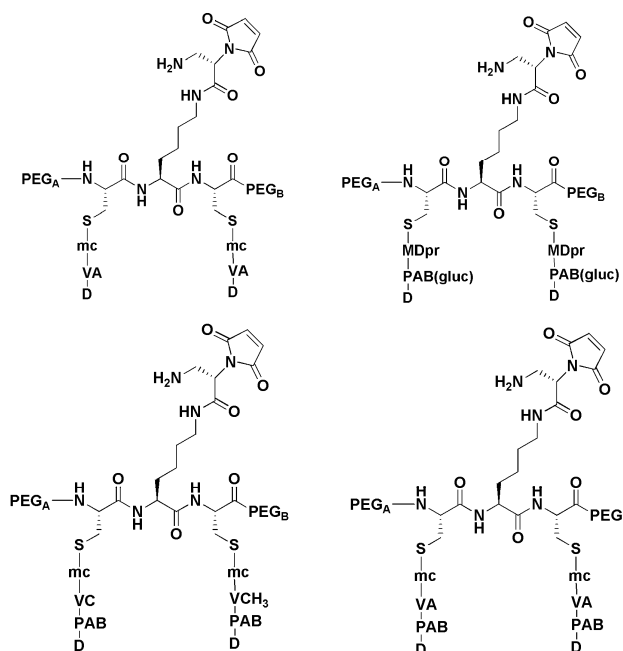
где волнистая линия к сукцинимидной группе указывает ковалентное связывание с пегилированным каркасом и волнистая линия к карбонилу указывает ковалентное связывание с остальной частью -X-D, в любой из представленных выше структур, где такая mc группа присутствует, замещают MDpr группой, которая имеет структуру



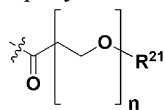
где R^{PR} представляет собой водород или защитную группу, с получением MDpr-VC-PAB-D, MDpr-VA-D и MDpr-VA-PAB-D, которые представляют собой дополнительные иллюстративные -X-D группы.

Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид в MDpr в любой из MDpr-содержащих групп -X-D может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи). -X-D группа, включающая mc, также может иметь сукцинимидное кольцо в гидролизованной форме.

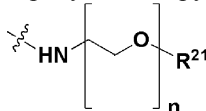
Другие иллюстративные соединения лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению, которые обеспечивают 2X нагрузку лекарственным средством, включают следующие:



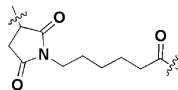
где mc-VA-D, mc-VC-PABA-D, mc-VA-PABA-D и MDpr-PAB(gluc)-D являются иллюстративными X-D группами, как описано для представленных выше структур с 2X нагрузкой лекарственным средством, и где ПЭГ_A и ПЭГ_B, независимо выбранные, имеют значение, определенное в любом из вариантов осуществления для ПЭГ групп, представленных в настоящей заявке, и могут быть дисперсными, когда это относится к популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство (т.е. LDC композиции), полученных с использованием дисперсного предшественника ПЭГ группы, где дисперсный предшественник ПЭГ группы предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу пика, соответствующую ПЭГ группе, имеющей *n* от около 8 до около 24 субъединиц или от около 12 до около 38 субъединиц, или ПЭГ_A является не-дисперсной (т.е. ПЭГ группа, содержащая дискретное количество ПЭГ субъединиц, определяемое целым числом, таким образом, каждый LDC из LDC композиции, состоящей из таких ADC, будет содержать ПЭГ группу, которая имеет такое же целочисленное значение *n*). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ_A представляет собой не-дисперсную ПЭГ группу, имеющую структуру



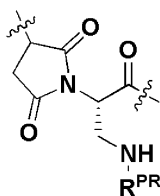
и/или ПЭГ_B представляет собой не-дисперсную ПЭГ группу, имеющую структуру



Где каждый R²¹ представляет собой независимо выбранную ПЭГ-Блокирующую группу, в каждом случае *n*, независимо выбранный, представляет собой целое число, имеющее значение от 8 до 24 или от 12 до 38. В предпочтительном варианте осуществления один R²¹ представляет собой -CH₃, а другой представляет собой -CH₂CH₂CO₂H. В некоторых вариантах осуществления, mc группу, которая имеет структуру



в любой из представленных выше структур, где такая группа присутствует, замещают MDpr группой, которая имеет структуру

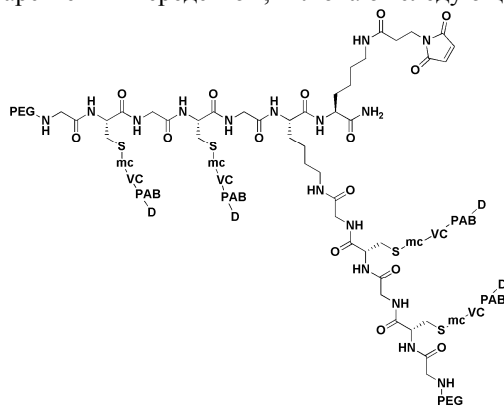


где R^{PR} представляет собой водород или защитную группу, с получением MDpr-VC-PAB-D, MDpr-VA-D и MDpr-VA-PAB-D в качестве-X-D,

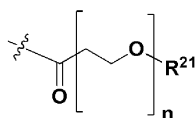
В других вариантах осуществления MDrg группу в представленной выше структуре, где такая группа присутствует, замещают mc группой с получением mc-PAB(gluc)D в качестве -X-D.

Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид в MDrg в любой из MDrg-содержащих групп -X-D может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи). -X-D группа, включающая mc, также может иметь сукцинимидное кольцо в гидролизованной форме.

Иллюстративные соединения лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению, которые обеспечивают 4X нагрузку лекарственным средством, включают следующие:



где mc-VC-PAB-D определен для описанных выше структур с 2X нагрузкой лекарственным средством; и ПЭГ имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и может быть дисперсным, когда это относится к популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство (т.е. LDC композиции), полученных с использованием дисперсного предшественника ПЭГ группы, где дисперсный предшественник ПЭГ группы предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу пика, соответствующую ПЭГ группе, имеющей n от около 8 до около 24 субъединиц или от около 12 до около 38 субъединиц, или является недисперсным (т.е. ПЭГ группа, содержащая дискретное количество ПЭГ субъединиц, определяемое целочисленным значением, таким, чтобы каждый LDC из LDC композиции, состоящей из таких ADC, содержал ПЭГ группу, которая имеет такое же целочисленное значение n). В некоторых вариантах осуществления недисперсная ПЭГ группа имеет структуру

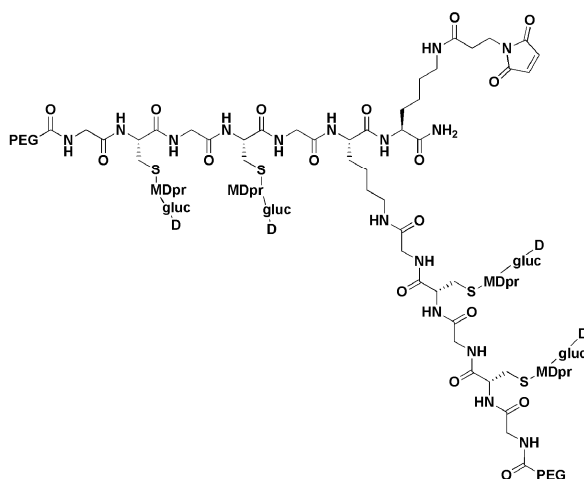


где R^{21} представляет собой ПЭГ-блокирующую группу, волнистая линия указывает ковалентное связывание с пегилированным каркасом, и n представляет собой целое число, имеющее значение от 8 до 24 или от 12 до 38. Предпочтительно R^{21} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

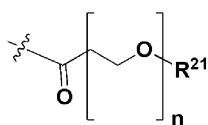
В некоторых вариантах осуществления, mc-VC-PAB-D в качестве -X-D групп замещают любой из -X-D групп, описанных в настоящей заявке, включая MDrg-VC-PAB-D, mc-VA-PAB-D и MDrg-VA-PAB-D.

Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид в MDrg в любой из MDrg-содержащих групп -X-D может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи). -X-D группа, включающая mc, может также иметь сукцинимидное кольцо в гидролизованной форме.

Другие иллюстративные соединения лекарственное средство-линкер по настоящему изобретению, которые обеспечивают 4X нагрузку лекарственным средством, включают следующие:



где MDpr-PAВ(gluc)-D имеет значение, определенное для представленных выше структур с 2X нагрузкой лекарственным средством; и ПЭГ имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, и может быть дисперсным, когда это относится к популяции конъюгатов лиганд-лекарственное средство (т.е. LDC композиции), полученных с использованием дисперсного предшественника ПЭГ группы, где дисперсный предшественник ПЭГ группы предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу пика, соответствующую ПЭГ группе, имеющей n от около 8 до около 24 субъединиц или от около 12 до около 38 субъединиц, или ПЭГ_A является не-дисперсным (т.е. ПЭГ группа, содержащая дискретное количество ПЭГ субъединиц, определяемое целочисленным значением, таким, чтобы каждый LDC из LDC композиции, состоящей из таких ADC, содержал ПЭГ группу, которая имеет такое же целочисленное значение n). В некоторых вариантах осуществления не-дисперсная ПЭГ группа имеет структуру

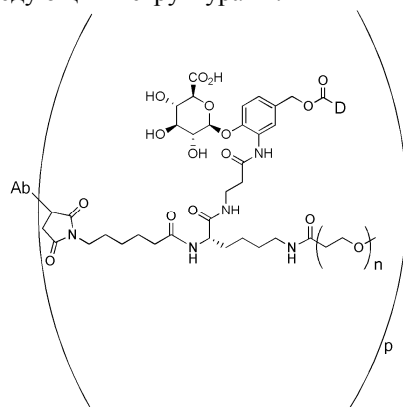


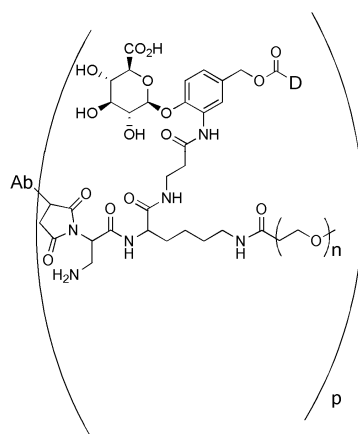
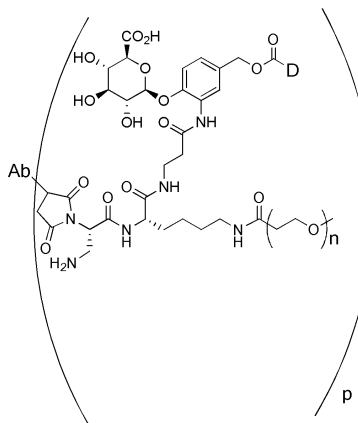
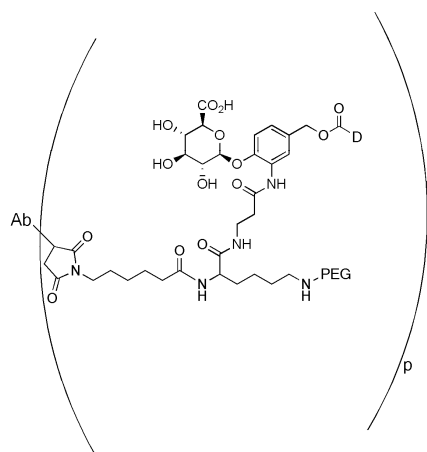
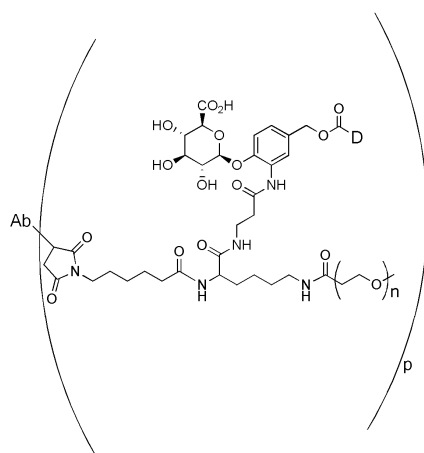
где R^{21} представляет собой ПЭГ-блокирующую группу, волнистая линия указывает ковалентное связывание с пегилированным каркасом, и n представляет собой целое число, имеющее значение от 8 до 24 или от 12 до 38. Предпочтительно R^{21} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

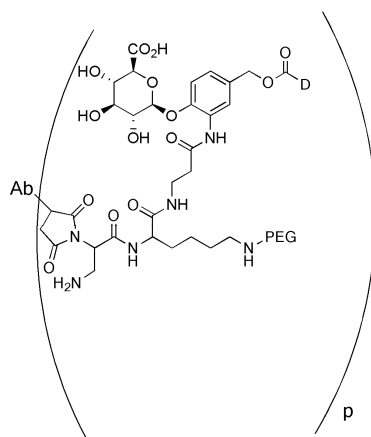
В некоторых вариантах осуществления MDpr-PAВ(gluc)-D в качестве -X-D замещают группой mc-PAВ(gluc)-D.

Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид в MDpr в любой из MDpr-содержащих групп -X-D может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи). -X-D группа, включающая mc, может также иметь сукцинимидное кольцо в гидролизованной форме.

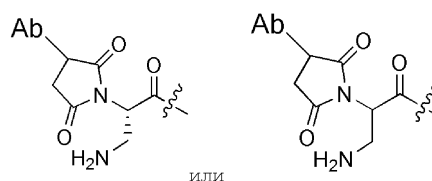
Иллюстративные конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению включают конъюгаты, представленные следующими структурами:







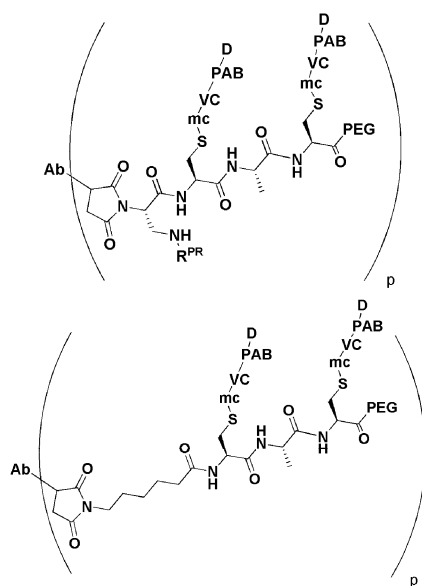
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12, от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 10, Ab представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело, D представляет собой группу лекарственного средства, и n представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72, от 12 до 36 или 38, от 6 до 24, или наиболее предпочтительно от 8 до 24. ПЭГ имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке для ПЭГ групп. Должно быть понятно, что Ab-замещенный сукцинимид может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи), особенно для тех конъюгатов антитело-лекарственное средство, которые имеют в своем составе группы, такие как



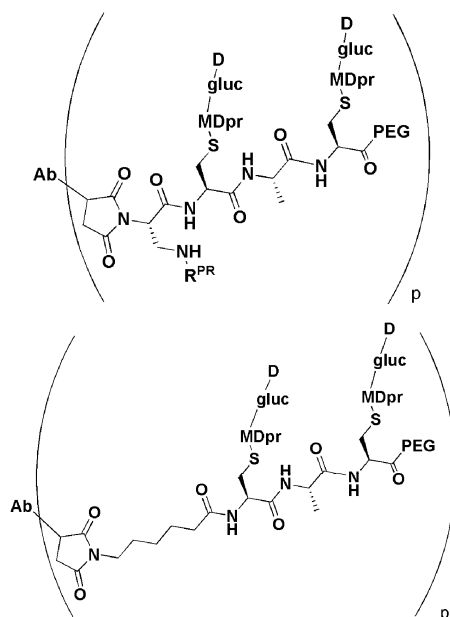
где волнистая линия указывает ковалентное связывание с остальной частью группы лекарственное средство-лиганд конъюгата антитело-лекарственное средство.

Должно быть понятно, что репрезентативные структуры, представленные выше, также могут представлять композиции, в этом случае p представляет собой среднее количество молекул лекарственное средство-линкер на лиганд в композиции. В таких вариантах осуществления, p типично не является целочисленным значением и может находиться в пределах от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12, от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 10.

Иллюстративные конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению, которые обеспечивают 2X нагрузку лекарственным средством, включают конъюгаты, представленные следующими структурами:



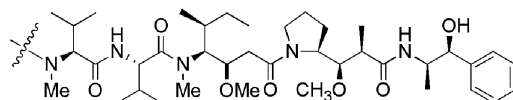
и те структуры, где -X-D группу mc -VC-PAB-D замещают любой из -X-D групп, описанных в настоящей заявке, включая mc -VA-PAB-D и MDpr-VA-PAB-D



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где p представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 12, от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 10, Ab представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело, D представляет собой группу лекарственного средства и n представляет собой целое число, имеющее значение от 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72, от 12 до 36 или 38, от 6 до 24, или наиболее предпочтительно от 8 до 24. ПЭГ имеет значение, определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке для ПЭГ групп. Должно быть понятно, что замещенный сукцинимид, связанный с Ab или S, может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи).

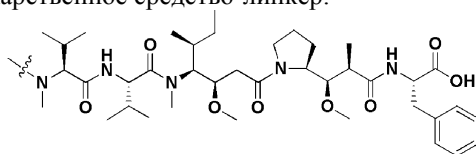
Должно быть понятно, что сукцинимид в MDpg группе, замещенной Ab, или в -X-D группе может существовать в гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе карбонил-азотные связи). Сукцинимид в ms группе, замещенной Ab, или в -X-D группе также может существовать в гидролизованной форме.

В любом из вариантов осуществления, описанных выше, группа лекарственного средства D может представлять собой MMAE, показанную ниже, где волнистая линия указывает участок присоединения к остальной части структуры лекарственного средство-линкер.

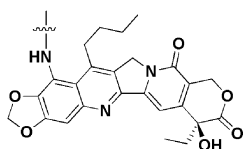


В некоторых предпочтительных аспектах, включая те, где D представляет собой MMAE, p имеет значение 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления, включая те, где D представляет собой MMAE, антитело конъюгируют с линкером через атом серы цистеинового остатка антитела. Цистеиновый остаток может быть природного или не природного происхождения. Например, в некоторых аспектах, цистеин будет происходить из межцепьевого дисульфида. В других аспектах цистеиновый остаток будет происходить из встроенного цистеина (например, цистеин, встроенный в положение 239). В некоторых аспектах, антитело будет присоединяться к группам лекарственное средство-линкер через его межцепьевые дисульфиды и через встроенные цистеины.

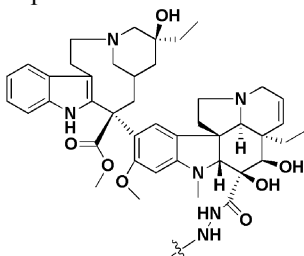
В любом из вариантов осуществления, описанных выше, группа лекарственного средства D может представлять собой MMAF, показанную ниже, где волнистая линия указывает участок присоединения к остальной части структуры лекарственного средство-линкер.



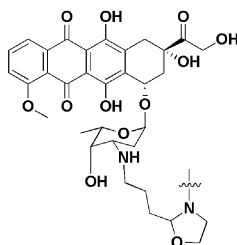
В любом из вариантов осуществления, описанных выше, группа лекарственного средства D может представлять собой камптотециновое соединение, являющееся иллюстрацией для камптотецина как такового, как показано ниже, где волнистая линия указывает участок присоединения к остальной части структуры лекарственного средство-линкер:



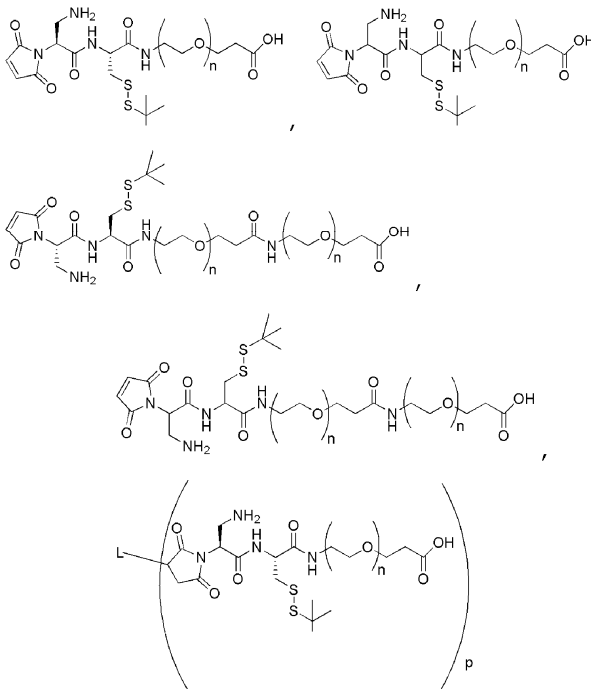
В любом из вариантов осуществления, описанных выше, группа лекарственного средства D может представлять собой соединение-алкалоид барвинка, являющийся иллюстрацией для винбластина гидрозида, как показано ниже, где волнистая линия указывает участок присоединения к остальной части структуры лекарственное средство-линкер:

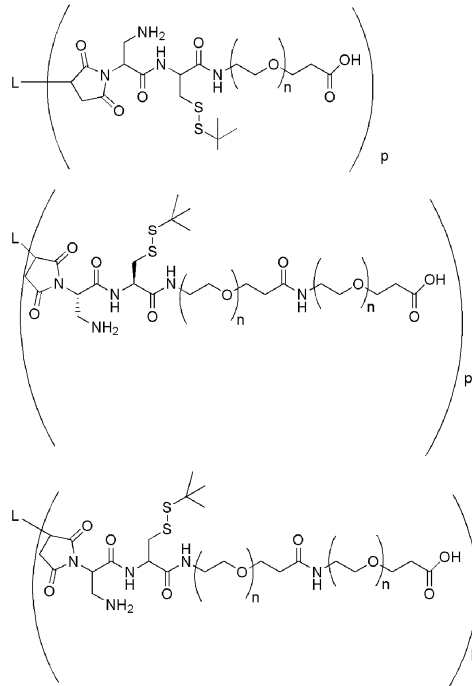


В любом из вариантов осуществления, описанных выше, группа лекарственного средства D может представлять собой антраклиновое соединение, проиллюстрированное ниже, где волнистая линия указывает участок присоединения к остальной части структуры лекарственное средство-линкер:



Примеры пегилированных каркасов в тиол-защищенных линкерных промежуточных соединениях и соответствующих лиганд-линкер соединениях по настоящему изобретению включают следующие:



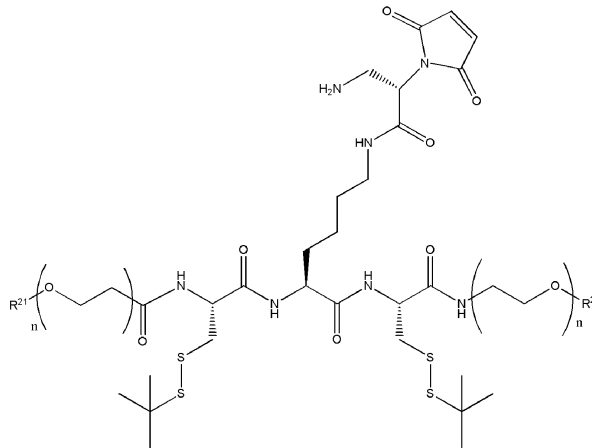


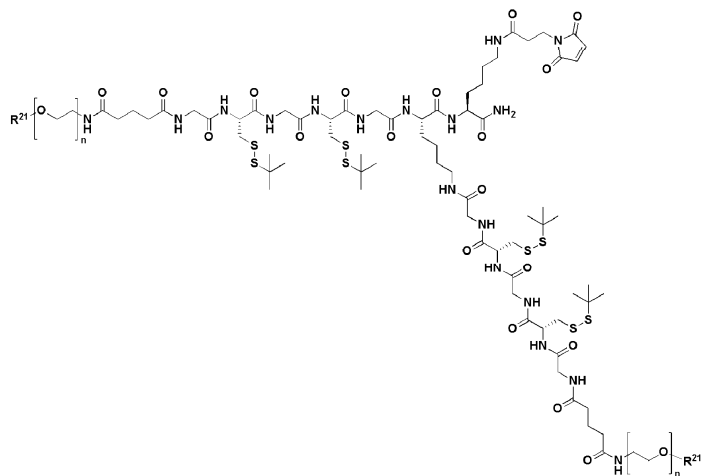
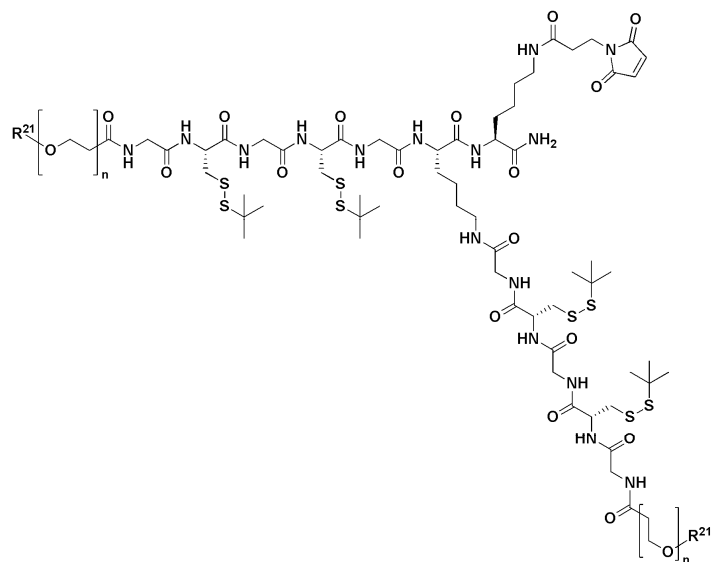
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где n имеет значение от 2 до 72, предпочтительно от 4 до 72 или от 8 до 72 или от 8 до 24; p имеет значение от 1 до 14, предпочтительно около 2 до около 12; и

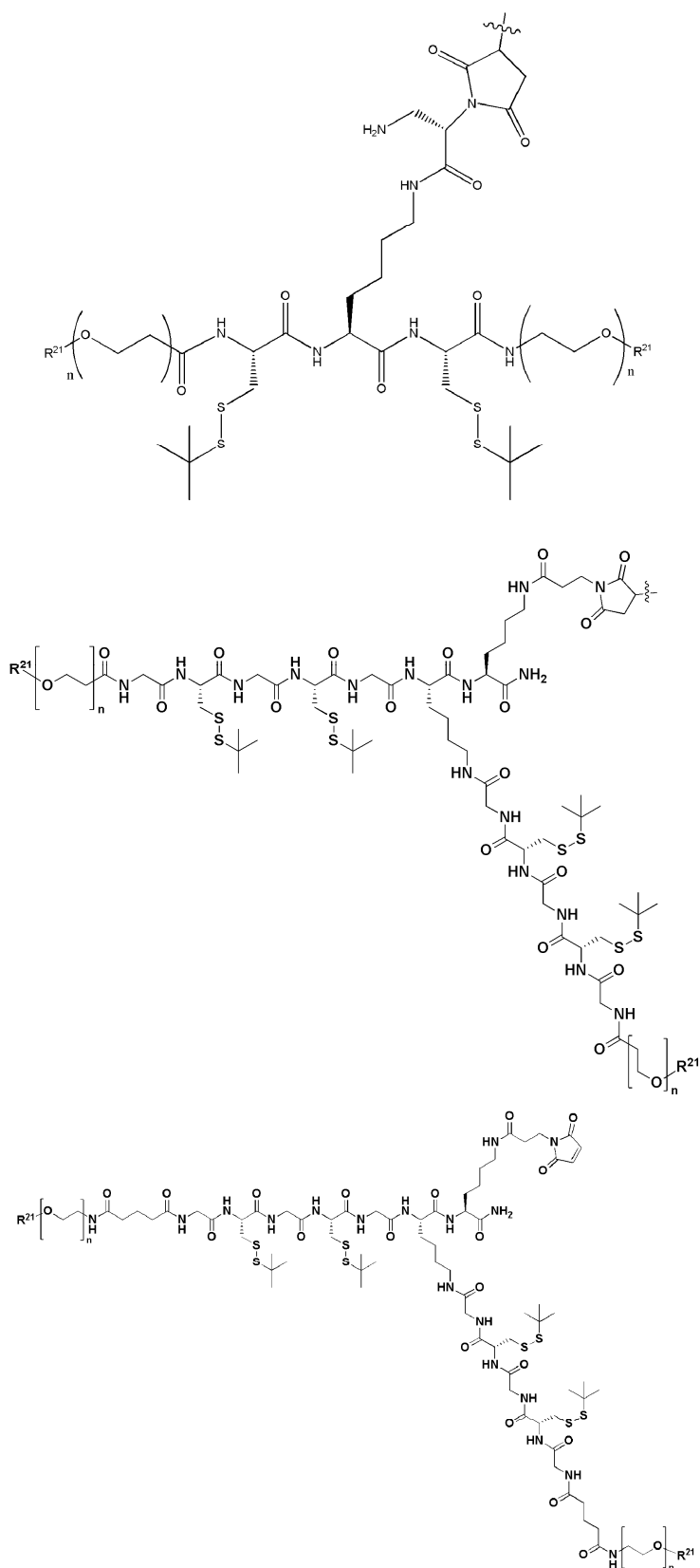
Ab представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело.

Как должно быть понятно, в формулах, представленных выше, лиганд-замещенные сукцинимиды могут существовать в их гидролизованной форме (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе C-N связи сукцинимиды). Кроме того, в любом из описанных выше вариантов осуществления трет-бутилтиольную защитную группу можно заменить другой подходящей тиол-защитной группой.

Иллюстративные мультиплексных пегилированных каркасов в качестве линкерных промежуточных соединений и соответствующих лиганд-линкер соединений по настоящему изобретению включают следующие:







где волнистая линия указывает ковалентное присоединение к группе лиганда, R^{21} независимо выбраны из ПЭГ-блокирующих групп, предпочтительно метила или 3-пропионовой кислоты, и n независимо имеет значение от 2 до 72, предпочтительно от 4 до 72, или от 8 до 72, или от 8 до 24, при этом 24 является более предпочтительным. Тиолзащитная группа может быть заменена другой подходящей тиолзащитной группой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления r имеет значение 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгируют с линкером через атом серы цистеинового остатка антитела. Цистеиновый остаток может быть природного или не природного происхождения. На-

пример, в некоторых вариантах осуществления, цистеин будет происходить из межцепьевого дисульфида. В других вариантах осуществления цистеиновый остаток будет происходить из встроенного цистеина (например, цистеин, встроенный в положение 239). В некоторых вариантах осуществления антитело будет присоединяться к группам лекарственного средство-линкер через его межцепьевые дисульфиды и через встроенные цистеины.

В некоторых аспектах настоящего изобретения в конъюгатах лиганд-лекарственное средство присутствует не больше чем 50, не больше чем 45, не больше чем 40, не больше чем 35, не больше чем 30 или не больше чем 25 промежуточных атомов между группой лиганда и группой лекарственного средства. В некоторых аспектах настоящего изобретения в конъюгатах лиганд-лекарственное средство присутствует не больше чем 40, не больше чем 35, не больше чем 30 или не больше чем 25 промежуточных атомов между группой лиганда и расщепляемой группой.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах лиганд-лекарственное средство между лигандом и группой лекарственного средства присутствует меньше промежуточных атомов, чем количество атомов в ПЭГ группе. В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах лиганд-лекарственное средство между лигандом и расщепляемой группой присутствует меньше промежуточных атомов, чем количество атомов в ПЭГ группе.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах лиганд-лекарственное средство между лигандом и группой лекарственного средства присутствует меньше промежуточных атомов, чем количество промежуточных атомов между дистальным концом ПЭГ группы и параллельным соединительным звеном. В некоторых вариантах осуществления в конъюгатах лиганд-лекарственное средство между лигандом и расщепляемой группой присутствует меньше промежуточных атомов, чем количество промежуточных атомов между дистальным концом ПЭГ группы и параллельным соединительным звеном.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственное средство предпочтительно представляет собой ауристин (например, ММАЕ или ауристин, имеющий сопоставимую или более высокую гидрофобность, чем ММАЕ), высвобождаемая комплексная группа включает глюкуронидное звено, расщепляемое бета-глюкуро니다зой; и ПЭГ группа включает по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 12 субъединиц, но не больше чем 72 субъединиц, предпочтительно не больше чем 36 или 24 субъединиц. В предпочтительных аспектах, ПЭГ группа будет включать от около 8 до около 24 субъединиц, наиболее предпочтительно около 12 субъединиц. Другие компоненты конъюгата лиганд-лекарственное средство или их промежуточные соединения могут быть такими, как описано в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке.

Предпочтительные композиции по настоящему изобретению включают популяцию конъюгатов лиганд-лекарственное средство, где группа лиганда представляет собой антитело (например, интактное антитело), группа лекарственного средства представляет собой ауристин или неауристин (предпочтительно ауристин, например, ММАЕ или ауристин, имеющий сопоставимую или более высокую гидрофобность, чем у ММАЕ), высвобождаемая комплексная группа включает глюкуронидное звено, расщепляемое бета-глюкуро니다зой; ПЭГ группа включает по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 12 субъединиц, но не больше чем 72 субъединиц, предпочтительно не больше чем 36 или 24 субъединиц; и среднее количество лекарственного средство-линкер групп на антитело в композиции составляет по меньшей мере 6 или по меньшей мере около 8. В предпочтительных аспектах, ПЭГ группа будет включать от около 8 до около 24 субъединиц, наиболее предпочтительно около 12 субъединиц. Другие компоненты конъюгата лиганд-лекарственное средство могут быть такими, как описано в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке.

Способы применения

Лечение рака

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство являются полезными для ингибирования размножения опухолевой клетки или раковой клетки, вызывая апоптоз в опухолевой или раковой клетке, или для лечения рака у пациента. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство соответственно можно использовать в различных условиях для лечения рака. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство можно использовать для доставки лекарственного средства к опухолевой клетке или раковой клетке. Не будучи связанной теорией, в одном варианте осуществления группа лиганда конъюгата лиганд-лекарственное средство связывается с или вступает в ассоциацию с раковой клеткой- или опухолевой клеткой-ассоциированным антигеном, и конъюгат лиганд-лекарственное средство может захватываться (интернализироваться) внутрь опухолевой клетки или раковой клетки через рецептор-опосредованный эндоцитоз или другой механизм интернализации. Антиген может быть присоединен к опухолевой клетке или раковой клетке или может представлять собой белок внеклеточного матрикса, ассоциированный с опухолевой клеткой или раковой клеткой. При попадании внутрь клетки, через расщепляемый механизм, лекарственное средство высвобождается внутри клетки. В альтернативном варианте осуществления лекарственное средство или группа лекарственного средства отщепляется от конъюгата лиганд-лекарственное средство вне опухолевой клетки или раковой клетки, и лекарственное средство или группа лекарственного средства затем проникает в клетку.

В одном варианте осуществления группа лиганда связывается с опухолевой клеткой или раковой клеткой.

В другом варианте осуществления группа лиганда связывается с опухолевой клеткой или антигеном раковой клетки, который находится на поверхности опухолевой клетки или раковой клетки.

В другом варианте осуществления группа лиганда связывается с опухолевой клеткой или антигеном раковой клетки, который представляет собой белок внеклеточного матрикса, ассоциированный с опухолевой клеткой или раковой клеткой.

Специфичность группы лиганда в отношении конкретной опухолевой клетки или раковой клетки может иметь важное значение для определения тех типов опухоли или рака, которые наиболее эффективно лечатся. Например, конъюгаты лиганд-лекарственное средство, которые нацелены на антиген раковой клетки, присутствующий в гематопозитических раковых опухолях, могут быть полезными для лечения гематологических злокачественных заболеваний (например, анти-CD30, анти-CD70, анти-CD19, анти-CD33 связывающая группа лиганда (например, антитело) может быть полезной для лечения гематологических злокачественных заболеваний). Конъюгаты лиганд-лекарственное средство, которые нацелены на антиген раковой клетки, присутствующий на солидных опухолях, могут быть полезными для лечения таких солидных опухолей.

Типы рака, которые можно лечить конъюгатом лиганд-лекарственное средство, включают, но не ограничиваются этим, гематопозитический рак, такой как, например, лимфомы (лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы) и лейкозы и солидные опухоли. Примеры гематопозитического рака включают, фолликулярную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, мантийноклеточную лимфому, острый миелобластный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и множественную миелому. Примеры солидных опухолей включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак почки, рак поджелудочной железы, рак кости, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, эзофагеальный рак, рак желудка, рак ротовой полости, назальный рак, рак горла, сквамозноклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовой железы, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхиогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильма, цервикальный рак, рак матки, тестикулярный рак, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, рак легкого, эпителиальную карциному, глиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому, менингиому, рак кожи, меланому, нейробластому и ретинобластому.

Мультимодальная терапия рака

Рак, включая, но не ограничиваясь этим, опухоль, метастазы или другое заболевание или расстройство, характеризующееся неконтролируемым клеточным ростом, можно лечить или ингибировать путем введения конъюгата лиганд-лекарственное средство.

В других вариантах осуществления, обеспечиваются способы лечения рака, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство и химиотерапевтического средства. В одном варианте осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой такое, при применении которого для лечения не было обнаружено, что рак является резистентным к нему. В другом варианте осуществления, химиотерапевтическое средство представляет собой такое, при применении которого для лечения было обнаружено, что рак является резистентным к нему. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство можно вводить пациенту, который также перенес хирургическую операцию для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления, пациент также принимает дополнительное лечение, такое как лучевая терапия. В специальном варианте осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство вводят одновременно с химиотерапевтическим средством или с лучевой терапией. В другом специальном варианте осуществления химиотерапевтическое средство или лучевую терапию применяют до или после введения конъюгата лиганд-лекарственное средство.

Химиотерапевтическое средство можно вводить в течение нескольких сеансов. Можно вводить любое одно или комбинацию химиотерапевтических средств, например, являющееся стандартом лечения химиотерапевтическое средство(средства).

Кроме того, способы лечения рака конъюгатом лиганд-лекарственное средство обеспечиваются как альтернатива химиотерапии или лучевой терапии, когда химиотерапия или лучевая терапия оказалась или может оказаться слишком токсичной, например, приводит к неприемлемым или непереносимым побочным эффектам, для субъекта, принимающего лечение. Для пациента, принимающего лечение, необязательно, можно применять другое лечение рака, такое как хирургическая операция, лучевая терапия или химиотерапия, в зависимости от того, какое лечение находят приемлемым или переносимым.

Лечение аутоиммунных заболеваний

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство являются полезными для киллинга или ингибирования репликации клетки, которая вызывает аутоиммунное заболевание, или для лечения аутоиммунного заболевания. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство можно использовать соответственно в различном окружении для лечения аутоиммунного заболевания у пациента. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство можно использовать для доставки лекарственного средства к клетке-мишени. Не будучи связанным теорией, в одном варианте осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство связывается с антигеном на поверхности клетки-мишени и конъюгат лиганд-лекарственное средство затем поглощается внутрь клетки-мишени через рецептор-опосредованный эндоцитоз. При попадании внутрь клетки линкерная группа отщепляется, приводя к высвобождению лекарственного средства или группы лекарственного средства. высвобожденное лекарственное средство после этого является свободным для миграции в цитозоль и индукции цитотоксической или цитостатической активностей. В альтернативном варианте осуществления лекарственное средство отщепляется от конъюгата лиганд-лекарственное средство вне клетки-мишени и лекарственное средство или группа лекарственного средства затем проникает в клетку.

В одном варианте осуществления группа лиганда связывается с аутоиммунным антигеном. В одном аспекте, антиген находится на поверхности клетки, вовлеченной в аутоиммунное состояние.

В другом варианте осуществления группа лиганда связывается с аутоиммунным антигеном, который находится на поверхности клетки.

В одном варианте осуществления группа лиганда связывается с активированными лимфоцитами, которые ассоциируются с аутоиммунным болезненным состоянием.

Еще в одном варианте осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство убивает или ингибирует размножение клеток, которые продуцируют аутоиммунное антитело, ассоциированное с конкретным аутоиммунным заболеванием.

Конкретные типы аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить конъюгатами лиганд-лекарственное средство, включают, но не ограничиваются этим, Th2 лимфоцит-связанные расстройства (например, атопический дерматит, атопическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Омена, системный склероз и болезнь трансплантат-против-хозяина); Th1 лимфоцит-связанные расстройства (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейва, первичный билиарный цирроз, грануломатоз Вегенера и туберкулез); и активированный В лимфоцит-связанные расстройства (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа).

Мультилекарственная терапия аутоиммунных заболеваний

Также раскрываются способы лечения аутоиммунного заболевания, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство и другого известного терапевтического средства для лечения аутоиммунного заболевания.

Композиции и способы введения

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, включающие конъюгаты лиганд-лекарственное средство, описанные в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство могут быть в любой форме, которая обеспечивает возможность введения соединения пациенту для лечения расстройства, связанного с экспрессией антигена, с которым связывается группа лиганда. Например, конъюгаты могут быть в форме жидкости или твердого вещества. Предпочтительным путем введения является парентеральный. Парентеральное введение включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интратермальную инъекцию или инфузии. В одном аспекте, композиции вводят парентерально. В одном аспекте, конъюгаты вводят внутривенно. Введение можно осуществлять любым удобным путем, например, при помощи инфузии или болюсной инъекции.

Фармацевтические композиции можно сформулировать так, чтобы соединение было биодоступным при введении композиции пациенту. Композиции могут иметь форму одной или нескольких единиц дозирования, при этом, например, таблетка может представлять собой одну единицу дозирования.

Вещества, используемые для получения фармацевтических композиций, могут быть нетоксичными в используемых количествах. Средним специалистам в данной области будет очевидно, что оптимальная доза активного ингредиента(ингредиентов) в фармацевтической композиции будет зависеть от различных факторов. Такие факторы включают, без ограничения, тип животного (например, человек), конкретную форму соединения, способ введения и используемую композицию.

Композиция может быть, например, в форме жидкости.

Такая жидкость может быть полезна для доставки при помощи инъекции. В композицию для введения при помощи инъекции также можно включить одно или несколько веществ, выбранных из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего вещества, диспергирующего вещества, суспендирующего вещества, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие композиции, находятся они в форме растворов, суспензий или в другой подобной форме, также могут включать одно или несколько из следующих веществ: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, рас-

твор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или среды для суспендирования, полиэтиленгликоли, глицерин, циклодекстрин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие вещества, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как аминокислоты, ацетаты, цитраты или фосфаты; детергенты, такие как неионные поверхностно-активные вещества, полиолы; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральная композиция может содержаться в ампуле, одноразовом шприце или многодозовом флаконе из стекла, пластика или другого материала. Физиологический солевой раствор является примером адьюванта. Композиция для инъекций предпочтительно является стерильной.

Количество конъюгата, которое является эффективным для лечения конкретного расстройства или состояния, будет зависеть от природы этого расстройства или состояния, и его можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, *in vitro* или *in vivo* анализы, необязательно, можно использовать для определения оптимальных диапазонов доз. Точная доза для использования в композициях также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания или расстройства, и ее определяют в соответствии с мнением лечащего врача и спецификой каждого пациента.

Композиции включают эффективное количество соединения, так, чтобы можно было получить подходящую дозу. Типично, это количество составляет по меньшей мере около 0,01% соединения в расчете на массу композиции.

Для внутривенного введения, композиция может включать от около 0,01 до около 100 мг конъюгата лиганд-лекарственное средство на кг массы тела животного. В одном аспекте, композиция может включать от около 1 до около 100 мг конъюгата лиганд-лекарственное средство на кг массы тела животного. В другом аспекте, вводимое количество будет находиться в пределах от около 0,1 до около 25 мг/кг массы тела.

Как правило, доза конъюгата, которую вводят пациенту, типично составляет от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, которую вводят пациенту, составляет от около 0,01 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, которую вводят пациенту, составляет от около 0,1 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, которую вводят пациенту, составляет от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 0,1 мг/кг до около 5 мг/кг или от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 1 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 0,1 до 4 мг/кг, еще более предпочтительно от 0,1 до 3,2 мг/кг, или даже еще более предпочтительно от 0,1 до 2,7 мг/кг массы тела субъекта на протяжении цикла лечения.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту или эксципиенту, с которым вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут быть жидкими, такими как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло. Носители могут представлять собой солевой раствор, арабийскую камедь, желатин, крахмальную пасту, тальк, кератин, коллоидный диоксид кремния, мочевины. Кроме того, можно использовать вспомогательные вещества, стабилизаторы, загустители, смазывающие вещества и красители. В одном варианте осуществления, при введении пациенту соединение или композиции и фармацевтически приемлемые носители являются стерильными. Вода является примером носителя, когда соединения вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические носители также включают эксципиенты, такие как крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, вода, этанол. Композиции по настоящему изобретению, если желательно, также могут содержать минорные количества смачивающих или эмульгирующих веществ или pH буферных веществ.

В одном варианте осуществления конъюгаты формулируют в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения животным, в частности, человеку. Типично, носители или несущая лекарственное вещество среда для внутривенного введения представляют собой стерильные изотонические водные буферные растворы. Если необходимо, композиции также могут включать солюбилизирующее вещество. Композиции для внутривенного введения необязательно включают местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли на участке введения инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в виде стандартной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывая количество активного вещества. Когда конъюгат предназначен для введения путем инфузии, он может поступать в продажу, например, с инфузионным флаконом, содержащим стерильную воду или солевой рас-

твор с фармацевтической степенью чистоты. Когда конъюгат вводят при помощи инъекции, может обеспечиваться ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

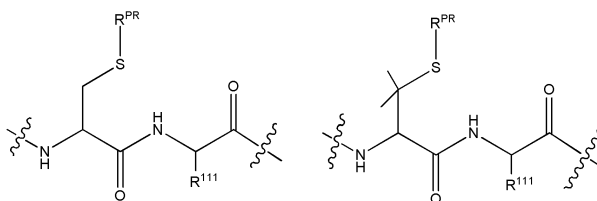
Фармацевтические композиции, как правило, формулируют как стерильные, по существу изотонические композиции и в полном соответствии со всеми требованиями по надлежащей производственной практике (GMP) Управления США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

Иллюстративные способы

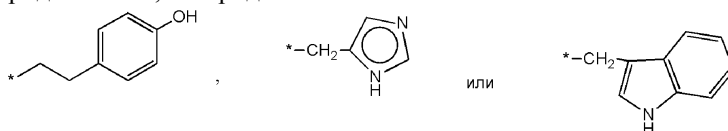
В настоящей заявке представлены способы получения соединения лекарственное средство-линкер, представленного структурой формулы (IV), (V) или (VI), описанной выше, при этом такой способ включает стадию (a): контактирование промежуточного линкерного соединения, представленного структурой формулы VII, VIII или IX, описанной в настоящей заявке, с достаточным количеством X'-D группы для взаимодействия с L^P или AD' с образованием, таким образом, L^P-X-D или AD-X-D группы для каждого случая L^P и AD', где -X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства; и X'-D представляет собой предшественник высвобождаемой комплексной группы, присоединенный к группе лекарственного средства, где X' является способным к взаимодействию с L^P и/или AD'.

В некоторых аспектах лекарственное средство-линкер, полученный таким образом, будет иметь структуру, представленную формулой IVa, IVb, Va, Vb, Vc, VIa или VIb, описанной в настоящей заявке, и промежуточное линкерное соединение, используемое на стадии (a), имеет структуру, представленную формулой VIIa, VIIb, VIIc, VIId, IXa или IXb, описанной в настоящей заявке.

Способ может дополнительно включать стадию (a'): удаление защиты у соответствующим образом защищенного промежуточного линкерного соединения, структура которого соответствует формуле VIIa, VIIb, VIIc, VIId, IXa или IXb, где t имеет значение O и где соответствующим образом защищенный AD' или L^P имеет структуру



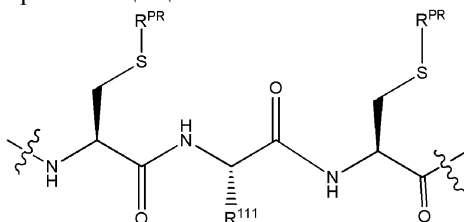
где R¹¹¹ независимо выбран из водорода, п-гидроксibenзила, метила, изопропила, изобутила, вторбутила, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, (CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, (CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, (CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-



с подходящей защитой, когда это необходимо, где R^{PR} представляет собой подходящую защитную группу тиола, и волнистая линия указывает ковалентное присоединение подходящей защищенной AD' или L^P группы в промежуточном линкерном соединении;

и на стадии (a) контактирование полученного незащищенного продукта формулы VIIa, VIIb, VIIc, VIId, IXa или IXb со стадии (a') с X'-D группой, где X' состоит из малеимидной группы, способной взаимодействовать со свободной тиольной группой AD' или L^P с образованием тιο-замещенной сукцинимидной группы.

Альтернативно, способ может дополнительно включать стадию a': удаление защиты у предшественника Промежуточного Линкерного соединения формулы VIIa, VIIb, VIIc, VIId, IXa или IXb, имеющего такую структуру, где t имеет значение 1, и AD'-AD' или AD'-L^P является подходящим образом защищенным, где подходящим образом защищенный AD'-AD' или AD'-L^P имеет структуру



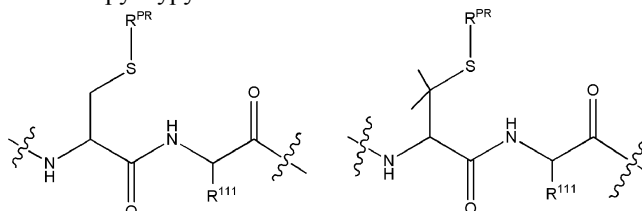
где R¹¹¹ представляет собой водород или метил и

R^{PR} представляет собой подходящую защитную группу тиола, которую удаляют, и волнистая линия указывает ковалентное присоединение подходящей защищенной AD' группы в промежуточном линкерном соединении; и на стадии (a) контактирование полученного незащищенного продукта формулы VIIa, VIIb, VIIc, VIId, IXa или IXb со стадии (a') с X'-D группой, где X' состоит из малеимидсодержащей группы, способной взаимодействовать со свободными тиольными группами AD'-AD' или AD'-L^{P'} с образованием тио-замещенных сукцинимидсодержащих групп.

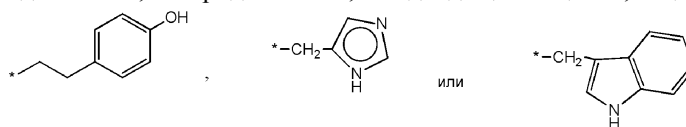
В настоящей заявке представлены способы получения конъюгата лиганд-лекарственное средство, представленного структурой формулы I, II или III, описанной выше, при этом такой способ включает следующие стадии (a): контактирование лиганд-линкер соединения, представленного структурой Формулы X, XI или XII, описанной выше, с достаточным количеством X'-D группы для взаимодействия с L^{P'} или AD' с образованием, таким образом, L^P-X-D или AD-X-D группы для каждого случая L^{P'} и AD', где -X-D представляет собой высвобождаемую комплексную группу, присоединенную к группе лекарственного средства; и X'-D представляет собой предшественника Высвобождаемой Комплексной Группы, присоединенного к группе лекарственного средства, где X' является способным к взаимодействию с L^{P'} и/или AD'.

Иллюстративный конъюгат лиганд-лекарственное средство, полученный таким образом, имеет структуру, представленную формулой Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa или IIIb, описанной выше, и соединение лиганд-линкер имеет структуру, представленную формулой XIa, XIb, XIc, XIId, XIIa или XIIb, описанной выше.

Способ может дополнительно включать стадию a': удаление защиты у соответствующим образом защищенного Лиганд-Линкер соединения, структура которого соответствует формуле X, XI, XII, XIa, XIb, XIc, XIId, XIIa или XIIb, описанной выше, где t имеет значение 0 и где соответствующим образом защищенный AD' или L^{P'} имеет структуру



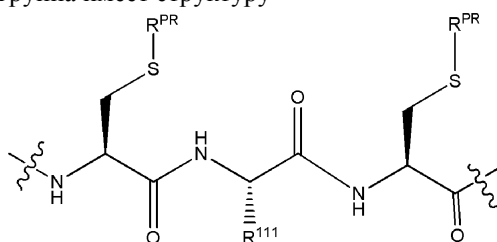
где R¹¹¹ независимо выбран из водорода, п-гидроксibenзила, метила, изопропила, изобутила, вторбутила, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, (CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, (CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, (CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, с подходящей защитой, когда это необходимо



где R^{PR} представляет собой подходящую защитную группу тиола и волнистая линия указывает ковалентное присоединение подходящей защищенной AD' или L^{P'} группы в промежуточном лиганд-линкер соединении;

и на стадии (a) контактирование полученного незащищенного продукта формулы X, XI, XII, XIa, XIb, XIc, XIId, XIIa или XIIb со стадии (a') с X'-D группой, где X' состоит из малеимидной группы, способной взаимодействовать со свободной тиольной группой AD' или L^{P'} с образованием тио-замещенной сукцинимидной группы.

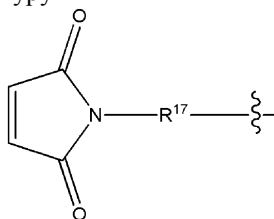
Альтернативно, способ может дополнительно включать стадию (a'): удаление защиты у лиганд-линкер соединения, структура которого соответствует формуле XIa, XIb, XIc, XIId, XIIa или XIIb, где t имеет значение 1 и AD'-AD' или AD'-L^{P'} является подходящим образом защищенной, где подходящим образом защищенная AD'-AD' группа имеет структуру



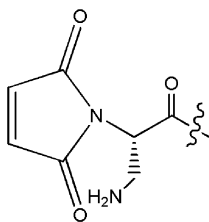
где R¹¹¹ представляет собой водород или метил и R^{PR} представляет собой подходящую защитную группу тиола, которую удаляют, и волнистая линия указывает ковалентное присоединение подходящей защищенной AD' группы в промежуточном лиганд-линкер соединении; и на стадии (a) контактирование

полученного незащищенного продукта формулы XIa, XIb, XIc, XIId, XIIa или XIIb со стадии (a') с X'-D группой, где X' состоит из малеимидсодержащей группы, способной взаимодействовать со свободными тиольными группами AD'-AD' или AD'-L^{PR} с образованием тиозамещенных сукцинимидсодержащих групп.

Иллюстративная малеимидная группа, способная взаимодействовать со свободным тиолом(тиолами) со стадии (a'), имеет структуру



где R¹⁷ представляет собой (CH₂)₅C(=O)- и волнистая линия указывает присоединение в X'-D группе, или имеет структуру:



где волнистая линия указывает присоединение в X'-D группе, и амино группа необязательно защищена амино-защитной группой, стабильной в условиях удаления защиты у R^{PR} защищенных тиольных групп.

Примеры

Общая информация.

Все коммерчески доступные безводные растворители использовали без дополнительной очистки. ПЭГ реагенты получали от компании Quanta BioDesign (Powell, OH). Аналитическую тонкослойную хроматографию осуществляли на покрытых силикагелем 60 F254 алюминиевых пластинах (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). Радиальную хроматографию осуществляли на устройстве Chromatotron (Harris Research, Palo Alto, CA).

Колоночную флэш-хроматографию осуществляли на системе очистки Biotage Isolera One (Charlotte, NC). Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на системе подачи растворителей Varian ProStar 210, сконфигурированной с Varian ProStar 330 PDA детектором. Элюирование образцов осуществляли через колонку с обращенной фазой C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å. Кислотная подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды, содержащих либо 0,05% трифторуксусной кислоты либо 0,1% муравьиной кислоты (указано для каждого соединения). Соединения элюировали с линейным градиентом кислотного ацетонитрила от 5% через 1 мин после ввода пробы до 95% через 11 мин, с последующим изократическим элюированием 95% ацетонитрила к 15 мин (скорость потока=1,0 мл/мин). ЖХ-МС осуществляли на двух разных системах. ЖХ-МС система 1 состояла из ZMD Micromass масс-спектрометра, связанного с HP Agilent 1100 ВЭЖХ устройством, снабженным C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å колонкой с обращенной фазой. Кислотный элюент состоял из линейного градиента ацетонитрила от 5% до 95% в 0,1% водном растворе муравьиной кислоты в течение 10 мин, с последующим изократическим 95% ацетонитрила в течение 5 мин (скорость потока=0,4 мл/мин). ЖХ-МС система 2 состояла из Waters Xevo G2 Tof масс-спектрометра, связанного с Waters 2695 Separations Модулем с Waters 2996 Детектором на фотодиодной матрице; колонка, подвижные фазы, градиент и скорость потока были такими же, как для ЖХ-МС системы 1.

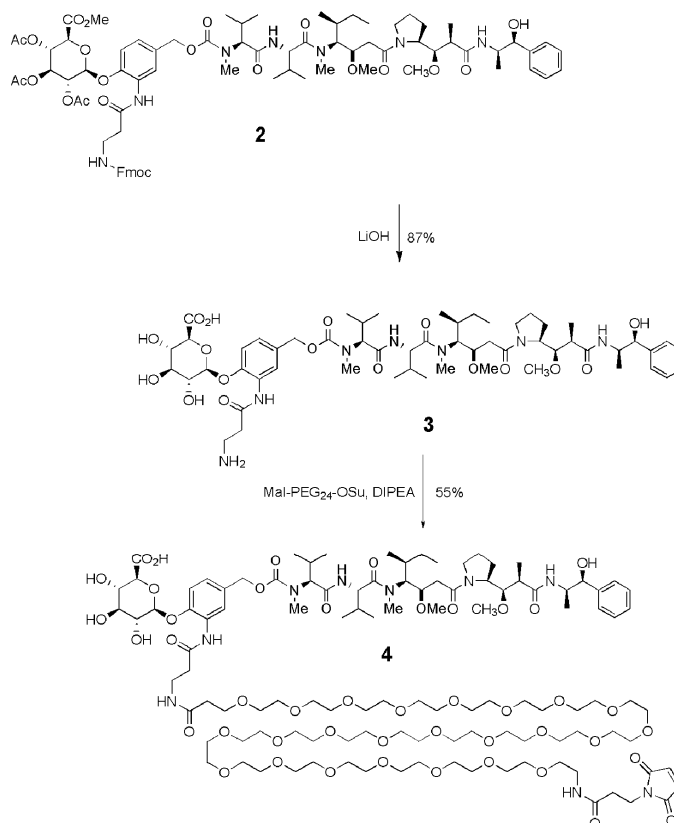
ЖХ-МС данные для конъюгатов антитело-лекарственное средство получали на системе Waters Xevo GS-S QTOF, объединенной с Waters Acquity H-Class ВЭЖХ системой. Образцы хроматографировали на аналитической колонке с обращенной фазой (Agilent Technologies, PLRP-S, 300Å, 2,1 мм в.д.×50 мм, 8 мкм) при 80°C и элюировали с линейным градиентом 0,01% TFA в ацетонитриле от 25% до 65% в 0,05% водном растворе TFA в течение 12,5 минут, с последующим изократическим элюированием 65% 0,01% TFA в ацетонитриле в течение 1,5 мин при скорости потока 1 мл/мин. Данные масс-спектрометрии для легкой и тяжелой цепей получали в ESI+ режиме с использованием массового диапазона 500-4000 m/z и осуществляли деконволюцию с использованием MaxEnt1 для определения масс полученных конъюгатов.

Препаративную ВЭЖХ осуществляли на системе подачи растворителей Varian ProStar 210, сконфигурированной с Varian ProStar 330 PDA детектором. Продукты очищали на колонке C12 Phenomenex Synergi 10,0×250 мм, 4 мкм, 80 Å с обращенной фазовой, элюируя при помощи 0,1% муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель В). Способ очистки состоял из следующего градиента растворителя А к растворителю В: 90:10 от 0 до 5 мин; 90:10 до 10:90

от 5 мин до 80 мин; с последующим изократическим 10:90 в течение 5 мин. Скорость потока составляла 4,6 мл/мин с регистрацией при 254 нм. Препаративную ВЭЖХ для соединений на схемах 3 и 4 осуществляли с использованием 0,1% трифторуксусной кислоты в обеих подвижных фазах вместо 0,1% муравьиной кислоты. Данные спектров ЯМР получали на Varian Mercury 400 МГц спектрометре. Константы взаимодействия (J) указаны в герцах.

Пример 1. Синтез соединения глюкуронид-ММАЕ лекарственное средство-линкер, включающего ПЭГ группу в последовательной ориентации

Схема 1.



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-аминопропанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (3):

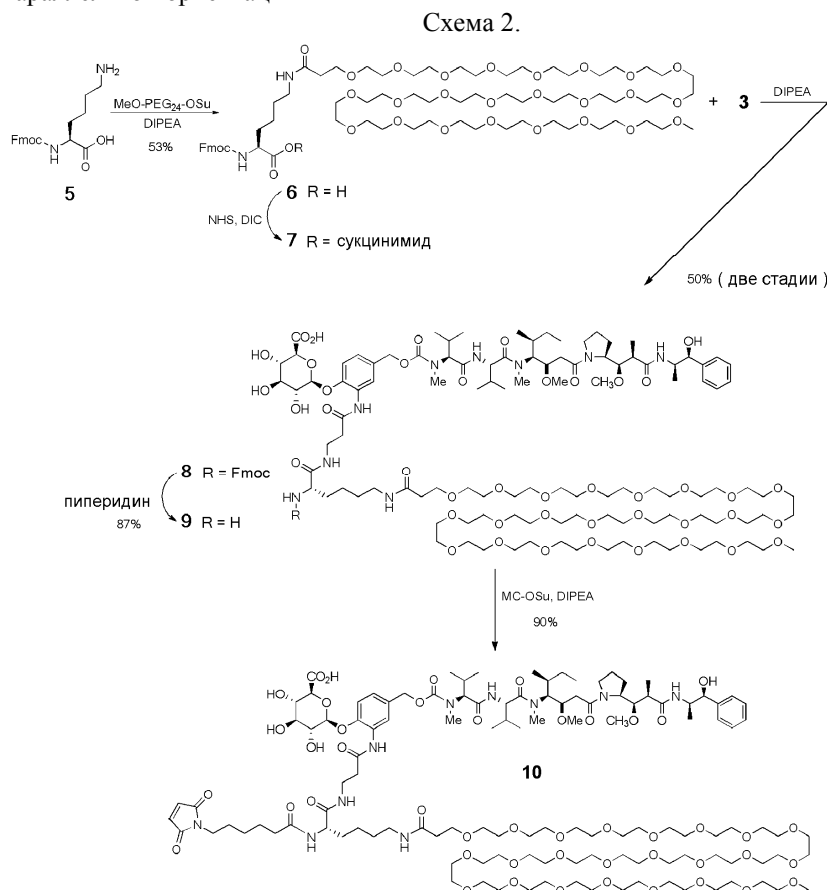
Синтез соединения 2 был описан ранее (Патентная публикация США 2008/0241128), этот документ включен в настоящую заявку посредством ссылки. В колбу, содержащую глюкуронид-ММАЕ промежуточное соединение 2 (40 мг, 26,8 мкмоль), добавляли 0,9 мл метанола и 0,9 мл тетрагидрофурана. Раствор затем охлаждали на ледяной бане и добавляли по каплям гидроксид лития моногидрат (6,8 мг, 161 мкмоль) в виде раствора в 0,9 мл воды. Реакционную смесь затем перемешивали на льду в течение 1,5 часа, когда ЖХ/МС анализ показал полное преобразование в продукт. Затем добавляли ледяную уксусную кислоту (9,2 мкл, 161 мкмоль) и реакционную смесь концентрировали досуха. После осуществления препаративной ВЭЖХ получали глюкуронид-ММАЕ линкерное промежуточное соединение 3 с полностью удаленной защитой (26 мг, 87%) в виде маслянистого остатка. Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 9,3 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 11,10 мин, m/z (ES^+) найдено 1130,48 ($M+H$)⁺, m/z (ES^-) найдено 1128,63 ($M-H$)⁻.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)-2-(1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,7,9-диоксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-4,80-диазатриоктаконтанамидо)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (4):

В колбу, содержащую незащищенное глюкуронид-ММАЕ промежуточное соединение 3 (26 мг, 2,3 мкмоль), растворенное в безводном DMF (0,94 мл), добавляли малеимида-ПЭГ24-NHS сложный эфир (32 мг, 23 мкмоль) в виде раствора в диметилацетамиде (200 мг/мл). Добавляли диизопропилэтиламин (20 мкл, 115 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при температуре окружающей среды в течение 6 часов, когда ЖХ/МС анализ показал преобразование в желаемый продукт. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением линейного малеимида-ПЭГ24-глюкуронид-

ММАЕ линкера 4 (31 мг, 55%) в виде маслянистого остатка. ^1H ЯМР (CD_3OD) δ (м.д.) 0,92 (м, 16H), 1,15 (м, 6H), 1,42 (м, 2H), 1,60 (м, 2H), 1,91 (м, 4H), 2,20 (м, 3H), 2,48 (м, 6H), 2,66 (м, 3H), 2,96 (м, 4H), 3,10 (с, 2H), 3,27 (с, 2H), 3,31 (с, 8H), 3,38 (м, 5H), 3,44 (м, 2H), 3,57 (м, 6H), 3,62 (м, 79H), 3,77 (м, 5H), 3,87 (т, $J=9$, 6 Гц, 2H), 4,05 (м, 1H), 4,21 (м, 3H), 4,53 (м, 2H), 4,61 (м, 2H), 4,80 (м, 2H), 5,14 (м, 3H), 6,82 (с, 2H), 7,10 (м, 2H), 7,21 (м, 2H), 7,35 (м, 2H), 7,39 (м, 2H), 7,74 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,94 (м, 2H), 8,10 (м, 1H), 8,27 (м, 2H). Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 9,9 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 11,94 мин, m/z (ES^+) найдено 1205,34 ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$. ЖХ-МС система 2: t_R 10,38 мин, m/z (ES^+) найдено 2410,3225 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Пример 2. Синтез соединения глюкуроид-ММАЕ лекарственное средство-линкер, включающего ПЭГ группу в параллельной ориентации



(S)-80-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагеноктаконтан-81-овая кислота (6):

В колбу, содержащую N_α -Fmoc-лизин 5 (30 мг, 81,5 мкмоль), добавляли 1,6 мл безводного дихлорметана с последующим добавлением метокси-ПЭГ-24-OSu (100 мг, 81,5 мкмоль). Затем добавляли DIPEA (71 мкл, 408 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре и затем осуществляли анализ ТСХ и ЖХ/МС. Через 2 часа ЖХ/МС анализ показал преобразование в продукт. Реакционный раствор разбавляли в дихлорметане и сразу наносили на 1 мм хроматографическую пластинку для очистки. Пластинку элюировали дихлорметаном с увеличивающимися количествами метанола (0% до 15%) с получением желаемого продукта 6 (63 мг, 53%). ТСХ: $R_f=0,17$, 10% MeOH в CH_2Cl_2 . ^1H ЯМР (CDCl_3) δ (м.д.) 1,48 (м, 6H), 2,47 (м, 5H), 3,20 (м, 2H), 3,38 (с, 3H), 3,63 (м, 86H), 4,16 (м, 2H), 4,36 (м, 1H), 7,26 (м, 3H), 7,35 (м, 2H), 7,60 (м, 2H), 7,71 (м, 3H). Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 10,8 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 11,95 мин, m/z (ES^+) найдено 1468,40 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z (ES^-) найдено 1466,36 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

(S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 80-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагеноктаконтан-81-оат (7):

В колбу загружали N_α -Fmoc-лизин (ПЭГ24)-ОН 6 (63 мг, 43 мкмоль) и 0,43 мл безводного тетрагидрофурана. Добавляли N-гидроксисукцинимид (5,5 мг, 47 мкмоль) с последующим добавлением диизопропилкарбодиимида (7,3 мкл, 47 мкмоль). Реакционный сосуд герметично закрывали и смесь перемешивали в атмосфере азота в течение ночи. Через 18 ч добавляли дополнительное количество N-гидроксисукцинимид (5,5 мг, 47 мкмоль) и диизопропилкарбодиимида (7,3 мкл, 47 мкмоль) и переме-

шивание продолжали еще в течение 4 ч, когда ЖХ/МС анализ показал полное преобразование в продукт. Неочищенный продукт разбавляли в дихлорметане и очищали радиальной хроматографией на 1 мм пластине, элюируя дихлорметаном с увеличивающимися количествами метанола (0 до 10%) с получением желаемого активированного сложного эфира 7 (36 мг). Это вещество использовали далее без дополнительной характеристики. ТСХ: $R_f=0,43$, 10% MeOH в CH_2Cl_2 . Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 11,4 мин. ЖХ-МС система 2: t_R 11,01 мин, m/z (ES^+) найдено 1564,8379 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-74,81-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82-диазапентаоктантамида)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизо-пропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокси-тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (8):

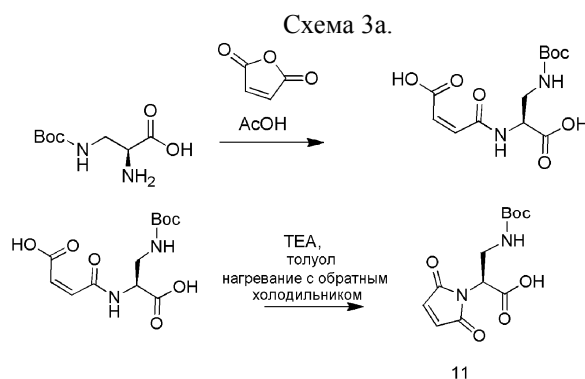
Незащищенный глюкуроид-ММАЕ линкерное промежуточное соединение 3 (26 мг, 23 мкмоль) растворяли в безводном диметилформамиде (0,58 мл) и добавляли в колбу, содержащую N_α -Fmoc-лизин(ПЭГ)-OSu 7 (36 мг, 23 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (20 мкл, 115 мкмоль), реакцию смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. Через 4,5 ч ЖХ-МС анализ показал преобразование в продукт. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением Fmoc-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ промежуточного соединения 8 (30 мг, 50% от двух стадий) в виде маслянистого остатка. Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 11,4 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 12,31 мин, m/z (ES^+) найдено 1291,05 ($M+2H$)²⁺. ЖХ-МС система 2: t_R 11,30 мин, m/z (ES^+) найдено 2580,2515 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-амино-74,81-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82-диазапентаоктантамида)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизо-пропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокси-тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (9):

Fmoc-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ промежуточное соединение 8 (30 мг, 12 мкмоль) растворяли в 0,46 мл безводного диметилформамида с последующим добавлением 0,12 мл пиперидина. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение 3 часов и затем концентрировали досуха. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением H-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ промежуточного соединения 9 (24 мг, 87%) в виде маслянистого остатка. ¹H ЯМР ($CDCl_3$) δ (м.д.) 0,92 (м, 14H), 1,14 (м, 6H), 1,42 (м, 5H), 1,79 (м, 8H), 2,22 (м, 3H), 2,42 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,47 (м, 2H), 2,65 (м, 2H), 2,76 (м, 2H), 2,95 (м, 3H), 3,10 (м, 3H), 3,31 (м, 8H), 3,35 (м, 6H), 3,54 (м, 5H), 3,63 (с, 70H), 3,72 (т, $J=6,0$ Гц, 3H), 3,85 (м, 2H), 4,07 (м, 1H), 4,22 (м, 3H), 4,52 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 4,61 (д, $J=6,4$ Гц, 1H), 4,71 (м, 2H), 5,11 (м, 3H), 7,12 (м, 1H), 7,21 (м, 1H), 7,31 (м, 3H), 7,37 (м, 2H), 7,75 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,89 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,95 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 8,26 (м, 2H). Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 8,9 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 11,18 мин, m/z (ES^+) найдено 1178,97 ($M+2H$)²⁺. ЖХ-МС система 2: t_R 9,50 мин, m/z (ES^+) найдено 2358,2341 ($M+H$)⁺.

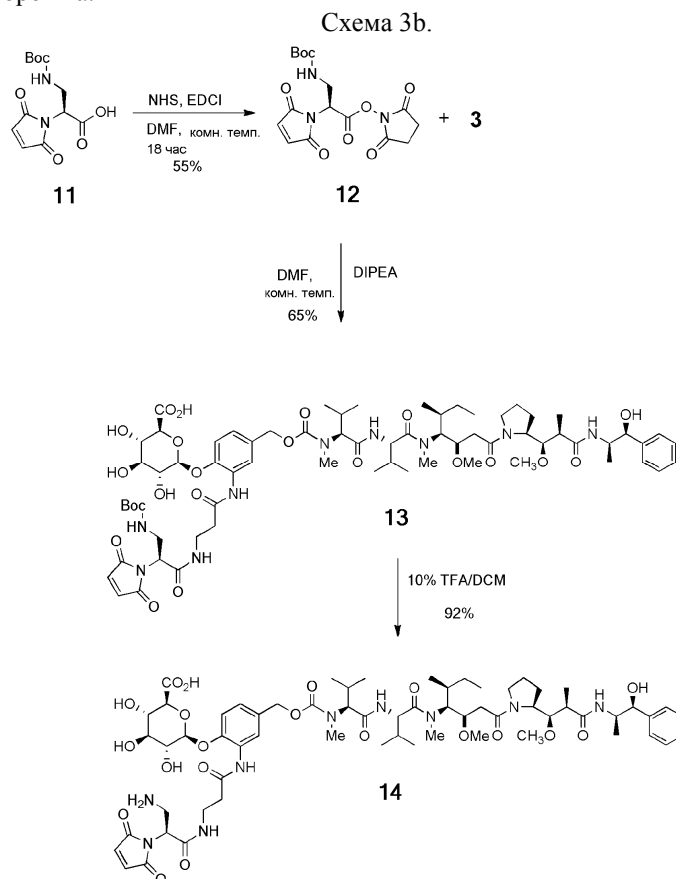
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизо-пропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)-2-((S)-80-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)гексанамида)-74,81-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82-диазапентаоктантамида)фенокси)-3,4,5-тригидрокси-тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (10): NHS эфир малеимидокапроновой кислоты (4,2 мг, 14 мкмоль) растворяли в 0,6 мл безводного диметилформамида и переносили в колбу, содержащую H-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ промежуточное соединение 9 (24 мг, 10 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (10 мкл, 58 мкмоль), реакционную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь очищали непосредственно сразу препаративной ВЭЖХ с получением MC-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ линкера 10 (23 мг, 90%) в виде маслянистого остатка. ¹H ЯМР (CD_3OD) δ (м.д.) 0,87 (м, 13H), 1,12 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,17 (д, $J=6,8$ Гц, 2H), 1,24 (м, 2H), 1,48 (м, 9H), 1,80 (м, 5H), 2,19 (м, 4H), 2,42 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,48 (м, 2H), 2,64 (м, 2H), 2,96 (м, 3H), 3,10 (с, 1H), 3,12 (м, 2H), 3,15 (с, 1H), 3,27 (с, 6H), 3,35 (м, 3H), 3,43 (м, 3H), 3,54 (м, 3H), 3,58 (м, 2H), 3,63 (м, 64H), 3,70 (м, 4H), 3,92 (м, 2H), 4,22 (м, 4H), 4,54 (м, 1H), 4,61 (т, $J=6,4$ Гц, 1H), 4,83 (м, 1H), 5,13 (м, 3H), 6,80 (с, 2H), 7,10 (м, 1H), 7,20 (м, 2H), 7,29 (м, 2H), 7,38 (м, 2H), 7,74 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,90 (м, 3H), 8,08 (с, 1H), 8,26 (м, 2H). Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): t_R 10,6 мин. ЖХ-МС система 1: t_R 11,88 мин, m/z (ES^+) найдено 1276,23 ($M+2H$)²⁺. ЖХ-МС система 2: t_R 10,54 мин, m/z (ES^+) найдено 2551,2871 ($M+H$)⁺.

Пример 3. Синтез соединения mDPR (малеими́до-диаминопропио́новый)глюкуро́нид-ММАЕ лекарственное средство-линкер



В 50 мл круглодонной колбе Н-DPR(бос)-ОН и малеиновый ангидрид растворяли в 4 об. уксусной кислоты и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе с получением масла и продукт осаждали путем добавления ~10 мл дихлорметана. Осадок собирали при помощи вакуумного фильтрования, промывали дихлорметаном и сушили в течение ночи в вакуумной печи.

Малеил-DPR(бос)-ОН суспендировали в толуоле (3 мл) и триэтиламине (224 мкл) над молекулярными ситами в 50-мл круглодонной колбе, снабженной холодильником. Добавляли DMA (~150 мкл) для облегчения растворения. Раствор нагревали до 125°C и кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч, после этого ЖХ/МС анализ показал, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали до суха на роторном испарителе, снова растворяли в DMSO и очищали препаративной ВЭЖХ. Продукт выделяли в виде белого порошка.



(S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноат (12):

(S)-N α -малеими́до-N β -Вос-диаминопропановую кислоту 11 (схема 3а) (400 мг, 1,4 ммоль) растворяли в 7 мл безводного диметилформаида. Добавляли N-гидроксисукцинимид (178 мг, 1,5 ммоль) с последующим добавлением 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (298 мг, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 3 ч. Водную обработку осуществляли путем разбавления в 120 мл воды; водный слой затем экстрагировали три раза при

помощи 60 мл этилацетата. Объединенный органический слой затем промывали насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали досуха. Продукт очищали колоночной флэш-хроматографией, элюируя смесью гексан:этилацетат (50:50 до 0:100), с получением NHS эфира (S)-N_α-малеимида-N_β-Вос-диаминопропановой кислоты [MDPr(Вос)-OSu] 12 (297 мг, 55%). ЖХ-МС система 1: t_R 12,23 мин, m/z (ES⁺) найдено 282,0599 (M+H-Вос групп)⁺. ЖХ-МС система 2: t_R 11,30 мин, m/z (ES⁺) найдено 2580,2515 (M+H)⁺.

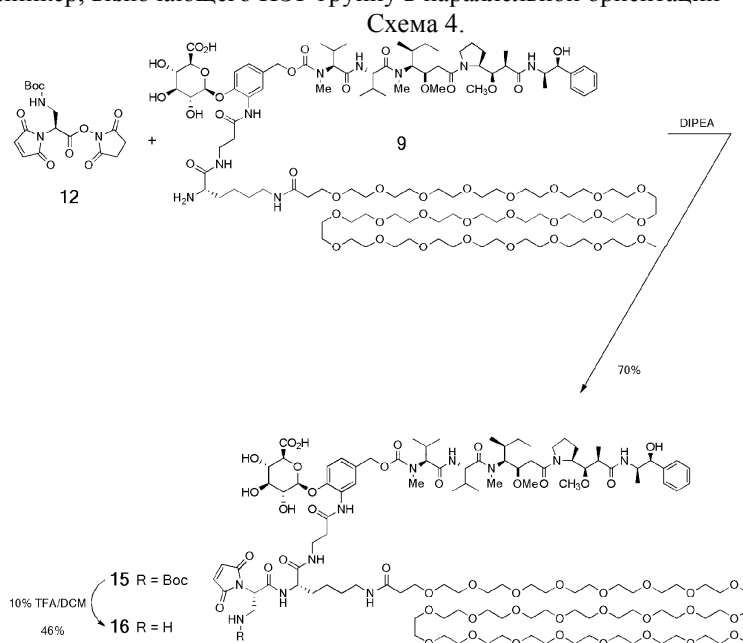
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)пропанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (13):

MDPr(Вос)-OSu 12 (33 мг, 86 мкмоль) растворяли в 1,1 мл безводного диметилформамида и добавляли в колбу, содержащую незащищенное глюкуроид-ММАЕ линкерное промежуточное соединение 3 (49 мг, 43 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (37 мкл, 220 мкмоль), реакционную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакцию гасили при помощи 37 мкл ледяной уксусной кислоты и смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr(Вос)-глюкуроид-ММАЕ промежуточного соединения 13 (39 мг, 65%). ЖХ-МС система 2: t_R 11,09 мин, m/z (ES⁺) найдено 1396,7321 (M+H)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)пропанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (14):

Колбу, содержащую MDPr(Вос)-глюкуроид-ММАЕ промежуточное соединение 13 (18 мг, 13 мкмоль), охлаждали до 0°C на ледяной бане в атмосфере азота. Добавляли по каплям раствор 10% трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1,3 мл). Реакционную смесь затем перемешивали при 0°C в течение 2 ч, когда ЖХ-МС анализ показал полное удаление защитной группы Вос. Реакционную смесь затем концентрировали с получением неочищенного остатка и очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr-глюкуроид-ММАЕ линкера 14 (15 мг, 92%). ЖХ-МС система 2: t_R 9,13 мин, m/z (ES⁺) найдено 1296,6697 (M+H)⁺.

Пример 4. Синтез соединения mDPR (малеимида-диаминопропионовый)глюкуроид-ММАЕ лекарственное средство-линкер, включающего ПЭГ группу в параллельной ориентации



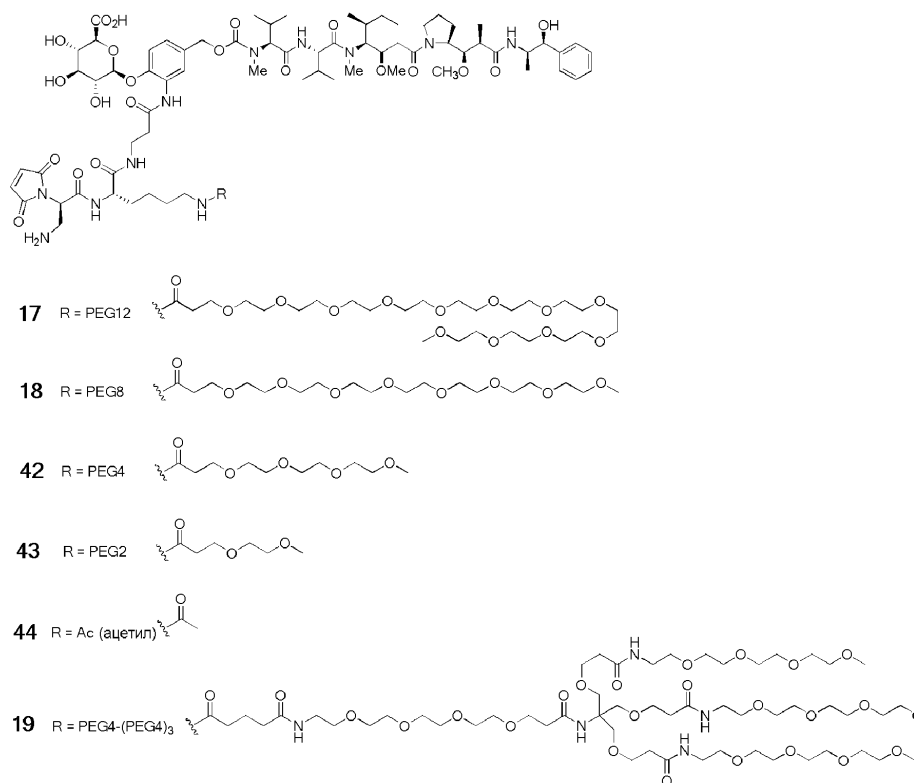
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-((S)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-74,81-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82-диазапентаоктаконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (15): MDPr(Вос)-OSu 12 (33 мг, 86 мкмоль) растворяли в 0,66 мл безводного диметилформамида и добавляли в колбу, содержащую H-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ линкерное промежуточное соединение 9 (135 мг, 57 мкмоль).

Затем добавляли диизопропилэтиламин (50 мкл, 290 мкмоль), реакционную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Реакцию гасили при помощи 50 мкл ледяной уксусной кислоты и очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr(Boc)-Lys(ПЭГ24)-глюкуронид-ММАЕ промежуточного соединения 15 (86 мг, 58%). ЖХ-МС система 2: t_R 11,71 мин, m/z (ES^+) найдено 2624,2004 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-((S)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-74,81-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82-диазепентаоктантамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксoproпил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (16): Колбу, содержащую MDPr(Boc)-Lys(ПЭГ24)-глюкуронид-ММАЕ промежуточное соединение 15 (86 мг, 33 мкмоль), охлаждали до 0°C на ледяной бане в атмосфере азота. Добавляли по каплям раствор 10% трифторуксусной кислоты в дихлорметане (3,3 мл). Реакционную смесь затем перемешивали при 0°C в течение 2 ч, когда ЖХ-МС показал полное удаление защитной группы Boc. Реакционную смесь затем концентрировали с получением неочищенного остатка и очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr-Lys(ПЭГ24)-глюкуронид-ММАЕ линкера 16 (38 мг, 46%). ЖХ-МС система 2: t_R 10,54 мин, m/z (ES^+) найдено 2524,2256 ($M+H$)⁺.

Пример 5. Синтез соединения mDPR (малеимида-диаминопропионового) глюкуронид-ММАЕ лекарственное средство-линкер, включающего ПЭГ12, ПЭГ8 или ПЭГ4-(ПЭГ4)₃ группу в параллельной ориентации

Схема 5.



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-дизанонатетраоктантамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксoproпил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (17):

MDPr-Lys(ПЭГ12)-глюкуронид-ММАЕ линкер 17 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 9,88 мин, m/z (ES^+) найдено 1996,1001 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-32-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-26,33-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаокса-27,34-дизагептатриаконтантамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксoproпил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (18):

MDPr-Lys(ПЭГ8)-глюкуронид-ММАЕ линкер 17 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 10,50 мин, m/z (ES^+) найдено 1818,8678 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-48-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-15,22,38,42,49-пентаоксо-20,20-бис(15-оксо-2,5,8,11,18-пентаокса-14-азанодекан-19-ил)-2,5,8,11,18,25,28,31,34-нонаокса-14,21,37,43,50-пентаазатрипентаконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (19):

MDPr-Lys(ПЭГ4[ПЭГ4]3)-глюкуронид-ММАЕ линкер 19 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 9,92 мин, m/z (ES^+) найдено 2674,3813 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-20-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-14,21-диоксо-2,5,8,11-тетраокса-15,22-диазапентакосанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (42): MDPr-Lys(ПЭГ4)-глюкуронид-ММАЕ линкер 42 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 10,18 мин, m/z (ES^+) найдено 1642,8586 ($M+H$)⁺.

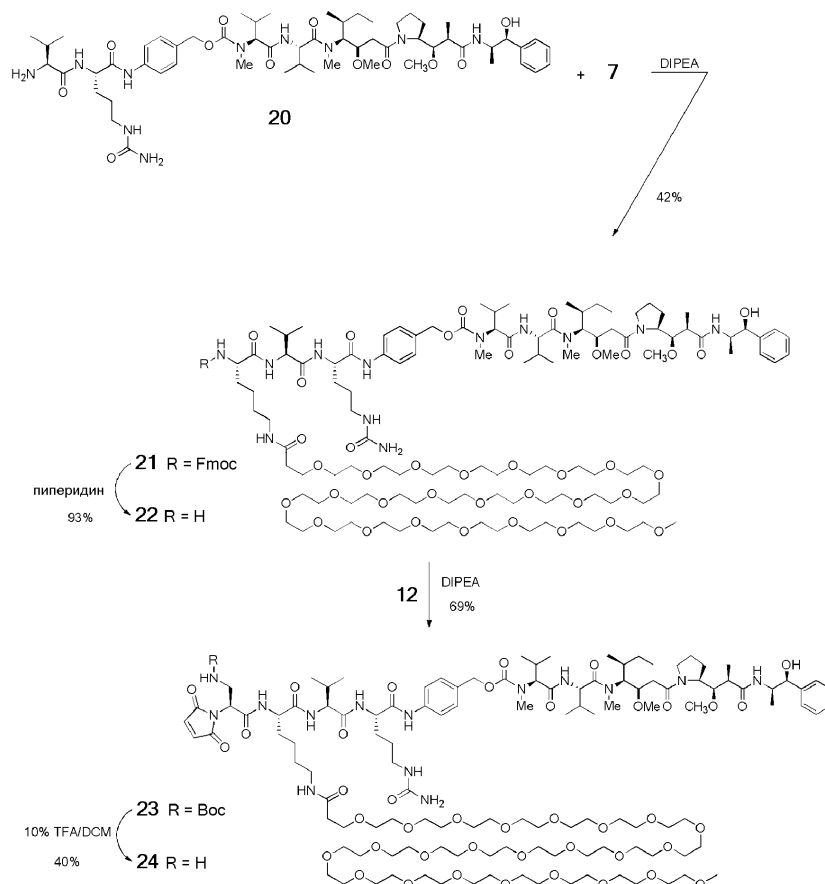
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-14-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-8,15-диоксо-2,5-диокса-9,16-диазадеканамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (43): MDPr-Lys(ПЭГ2)-глюкуронид-ММАЕ линкер 43 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 10,10 мин, m/z (ES^+) найдено 1554,8093 ($M+H$)⁺.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-6-ацетамидо)-2-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)гексанамидо)пропанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (44):

MDPr-Lys(Ac)-глюкуронид-ММАЕ линкер 44 получали способом, аналогичным способу получения соединения 16, описанному на схемах 2 и 4. ЖХ-МС система 2: t_R 10,38 мин, m/z (ES^+) найдено 1466,8109 ($M+H$)⁺.

Пример 6. Синтез соединения mDPR (малеими́до-диаминопропио́новый) валин-цитруллин-ММАЕ лекарственное средство-линкер, включающего ПЭГ группу в параллельной ориентации

Схема 6.



4-((80S,83S,86S)-80-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-83-изопропил-74,81,84-триоксо-86-(3-уреидопропил)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82,85-триазагептаоктантамидо)бензил

((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)(метил)карбамат (21):

ValCit-PAВ-ММАЕ линкерное (синтезированное, как описано в Патенте США № 7659241) промежуточное соединение 20 (16 мг, 14 мкмоль) растворяли в безводном диметилформамиде (0,28 мл) и добавляли в колбу, содержащую Na-Fmoc-лизин(ПЭГ)-OSu 7 (25 мг, 17 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (12 мкл, 70 мкмоль), реакционную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. Через 6 ч ЖХ-МС анализ показал преобразование в продукт. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением Fmoc-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ промежуточного соединения 21 (15 мг, 42%) в виде маслянистого остатка. Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиной кислоты): ЖХ-МС система 2: t_R 11,67 мин, m/z (ES^+) найдено 2573,2493 ($M+H^+$).

4-((80S,83S,86S)-80-амино-83-изопропил-74,81,84-триоксо-86-(3-уреидопропил)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82,85-триазагептаоктантамидо)бензил

((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)(метил)карбамат (22):

Fmoc-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ промежуточное соединение 21 (15 мг, 6 мкмоль) растворяли в 0,16 мл безводного диметилформамида, с последующим добавлением 0,04 мл пиперидина. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение 1,5 ч и затем концентрировали досуха. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением H-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ промежуточного соединения 22 (13 мг, 93%) в виде маслянистого остатка. ЖХ-МС система 2: t_R 9,72 мин, m/z (ES^+) найдено 2351,1787 ($M+H^+$).

4-((80S,83S,86S)-80-((S)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-83-изопропил-74,81,84-триоксо-86-(3-уреидопропил)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82,85-триазагептаок-

таконтанамидо)бензил

((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил) (метил)карбамат (23):

MDPr(Вос)-OSu 12 (4 мг, 11 мкмоль) растворяли в 0,12 мл безводного диметилформамида и добавляли в колбу, содержащую H-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ линкерное промежуточное соединение 22 (13 мг, 5,5 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (5 мкл, 28 мкмоль), реакционную смесь затем перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию гасили при помощи 5 мкл ледяной уксусной кислоты и очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr(Вос)-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ промежуточного соединения 23 (10 мг, 69%). ЖХ-МС система 2: t_R 11,25 мин, m/z (ES^+) найдено 2617,3203 ($M+H$)⁺.

4-((80S,83S,86S)-80-((S)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-83-изопропил-74,81,84-триоксо-86-(3-уреидопропил)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75,82,85-триазагепта-октаконтанамидо)бензил

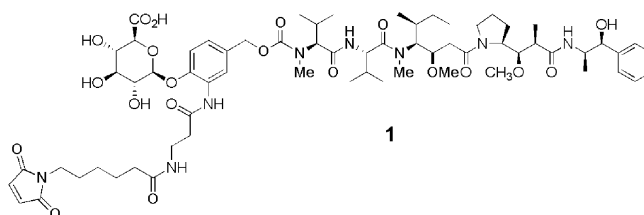
((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)(метил)карбамат (24):

Колбу, содержащую MDPr(Вос)-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ промежуточное соединение 23 (10 мг, 4 мкмоль), охлаждали до 0°C на ледяной бане в атмосфере азота. Добавляли по каплям раствор 10% трифторуксусной кислоты в дихлорметане (0,4 мл). Реакционную смесь затем перемешивали при 0°C в течение 3 ч. Реакционную смесь затем концентрировали с получением неочищенного остатка и очищали препаративной ВЭЖХ с получением MDPr-Lys(ПЭГ24)-ValCit-PAВ-ММАЕ линкера 24 (4 мг, 40%). ЖХ-МС система 2: t_R 9,81 мин, m/z (ES^+) найдено 2517,2930 ($M+H$)⁺.

Пример 7. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, демонстрируют *in vitro* активность аналогичную их непегилированным аналогам или ADC, включающим ПЭГ в последовательной ориентации

Клетки, которые культивировали в лог-фазе роста, высевали в 96-луночные планшеты, содержащие 150 мкл RPMI 1640, дополненной 20% FBS, в течение 24 ч. Серийные разведения ADC в клеточной культуральной среде получали при 4х рабочих концентрациях; 50 мкл каждого разведения добавляли в 96-луночные планшеты. После добавления ADC, клетки инкубировали с испытываемыми соединениями в течение 4 дней при 37°C. Через 96 ч оценивали ингибирование роста при помощи Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) и измеряли люминесценцию на планшет-ридере. IC₅₀ значение, определяемое в трех повторях, здесь определяется как концентрация, которая приводит к 50% уменьшению клеточного роста по сравнению с необработанными контролями.

Соединения 1, 4 и 10 конъюгировали через их межцепевые тиолы с химерным sAC10 антителом, описанным в Патенте США № 7090843, при средней нагрузке лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества на антитело. Соединения 4 и 10 описаны выше. Соединение 1 представляет собой следующее:



In vitro цитотоксическую активность полученных ADC измеряли против CD30⁺ и CD30⁻ клеточных линий. Ни добавление ПЭГ ни его конфигурация не имели существенного влияния на *in vitro* активность; наблюдали только незначительную разницу в ADC активности, и в двух клеточных линиях (L540су и Kargas-299) активность была по существу одинаковой (табл. 1).

Таблица 1. In vitro цитотоксическая активность анти-CD30 ADCs; значения представляют собой IC₅₀ значения в нг/мл

ADC	лекарственное средство/Ab	CD30+ клеточные линии			CD30-
		Karpas 299	L540cy	L428	
cAC10-1	8	2,5	4,4	9	отсутствие эффекта
cAC10-4	8	1,5	4,4	34	отсутствие эффекта
cAC10-10	8	1,7	6,6	13	отсутствие эффекта

Пример 8. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, демонстрируют благоприятную фармакокинетику по сравнению с ADC, включающими ПЭГ в последовательной ориентации

Радиоактивное мечение антитела и ADC - Фармакокинетические (ПК) эксперименты осуществляли с использованием радиомеченого антитела или ADC. Для ПК экспериментов испытываемые вещества метили радиоактивной меткой с использованием следующей процедуры. К раствору антитела или ADC в PBS, дополненном дополнительными 50 мМ фосфата калия (pH 8,0) и 50 мМ хлорида натрия, добавляли 55 мкКи N-сукцинимидилпропионата, [пропионат-2,3-³H]- (Moravek Biochemicals, Cat. No.: MT 919, 80 Ки/ммоль, 1 мКи/мл, раствор 9:1 гексан:этилацетат) на мг антитела или ADC. Полученную смесь подвергали вихревому перемешиванию и оставляли при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь центрифугировали при 4000xg в течение 5 мин и нижний водный слой удаляли и разделяли при помощи центрифужных фильтров Amicon Ultra-15 (Millipore, Cat. No.: UFC903024, 30 kDa MWCO). Несвязанную радиоактивность удаляли, используя 4 цикла разбавления и центрифугировали при 4000xg. Полученные продукты фильтровали через стерильные 0,22 мкм Ultrafree-MC центрифужные фильтры (Millipore, Cat. No.: UFC30GV0S) и конечную концентрацию антитела или ADC измеряли спектрофотометрически. Удельную радиоактивность (мкКи/мг) каждого продукта определяли методом жидкостного сцинтилляционного счета.

Фармакокинетические эксперименты - Фармакокинетические свойства неконъюгированного антитела или ADC исследовали в некоторых моделях грызунов. В каждом эксперименте 1-3 мг радиомеченого антитела или ADC на кг массы тела животного вводили путем инъекции через хвостовую вену. Каждое испытываемое средство вводили один раз нескольким животным параллельно. Кровь брали в K₂EDTA пробирки через подкожную вену или через сердечную пункцию для сбора терминальной крови в разных точках времени. Плазму отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10000xg. 10-20 мкл образца плазмы из каждой точки времени добавляли к 4 мл Ecoscint-A жидкого сцинтилляционного коктейля (National Diagnostics) и общую радиоактивность измеряли методом жидкостного сцинтилляционного счета. Полученные значения распадов в минуту преобразовывали в мкКи и удельную радиоактивность радиомеченных испытываемых веществ использовали для расчета концентрации антитела или ADC, остающихся в плазме в каждой точке времени. Фармакокинетические параметры (клиренс и AUC) определяли из полученных данных концентрации в плазме. Оцениваемые фармакокинетические параметры рассчитывали при помощи не-компаратментного анализа в Phoenix WinNonlin v6.3 (Pharsight, Mountain View, CA) с использованием опции для определения внутривенной болюсной дозы.

Соединения 1, 4 и 10 конъюгировали через их межцепевые тиолы с химерным cAC10 антителом, описанным в Патенте США № 7090843, который включен в настоящую заявку посредством ссылки, при средней нагрузке лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества на антитело. Как ожидалось, ADC, полученный с 8 копиями непегилированного лекарственного средства-линкера 1, продемонстрировали очень быстрый клиренс и низкую экспозицию по сравнению с неконъюгированным антителом (фиг. 7). К удивлению, пегилированное соединение лекарственное средство-линкер 4, содержащее ПЭГ в последовательной конфигурации, давало ADC с еще более быстрым клиренсом и более низкой экспозицией, чем непегилированный формат. Этот результат был неожиданным, учитывая количество известных из предшествующего уровня техники примеров ADC, полученных в соответствии с этой конструкцией. В отличие от этого, ADC, полученные с лекарственным средством-линкером 10, содержащим ПЭГ в параллельной конфигурации, давали ADC с значительно более медленным клиренсом и большей экспозицией по сравнению с непегилированным форматом (см. фиг. 7 и табл. 2).

Таблица 2

Конъюгат Лиганд- Лекарственное средство	Клиренс (мл/день/кг)	AUC _{0-inf} (день* мкг/мл)
cAC10	8,6	604,1
cAC10-1	48,6	67,0
cAC10-4	57,8	52,0
cAC10-10	14,2	229,7

Альтернативно, можно использовать анализ общего содержания антитела (Tab) на основе ELISA для получения фармакокинетических данных. 100 мкл раствора анти-человеческого IgG каппа антитела (0,5 мг/мл, растворы антител, Mountain View CA) в 0,05M карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) добавляли в каждую лунку 96-луночного полистирольного планшета, покрытого MaxiSorp™ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшет промывали 3 раза при помощи PBS, содержащего 0,05% Tween-20 (PBS-T). Лунки затем блокировали при помощи PBS-T, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина, при комнатной температуре в течение по меньшей мере 1 часа. После блокирования планшет промывали 3 раза при помощи PBS-T. Концентрированные исходные растворы антитела или ADC стандартов (40 × концентрации) получали в плазме крысы или мыши для построения стандартной кривой. Образцы плазмы и стандарты затем разбавляли 1:40 в PBS-T. Разбавленные образцы и стандарты (100 мкл) добавляли в лунки ELISA планшета и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубации образцы удаляли и планшет промывали 3 раза при помощи PBS-T. Раствор Пероксидаза-AffiniPure F(ab')₂ Фрагмента Козлиного Анти-Человеческого IgG, Fcγ Фрагмент Специфического (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) разбавляли 1:30000 в PBS-T и 100 мкл добавляли в каждую лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации образцы извлекали и планшет промывали 3 раза при помощи PBS-T. Раствор SureBlueTMB Microwell Пероксидазного Субстрата (KPL, Inc. Gaithersburg, MD) добавляли в каждую лунку (100 мкл). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 11-12 мин и реакции гасили при помощи 100 мкл 1N раствора HCl. Планшеты считывали при 450 нм на планшет-ридере Molecular Devices Spectromax.

Пример 9.

ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, обладают лучшей *in vivo* активностью по сравнению с ADC, включающими ПЭГ в последовательной ориентации, или ADC, не содержащими ПЭГ группу *In vivo* модели ксенотрансплантата. Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по уходу за животными и их использованию в учреждении, полностью аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными. Эксперименты по оценке эффективности осуществляли на моделях ксенотрансплантата Karpas 299 анапластической крупноклеточной лимфомы, L540cy лимфомы Ходжкина, Ramos лимфомы Беркитта и MCF-7 рака молочной железы. Клеточные суспензии или фрагменты опухолей имплантировали подкожно мышам с ослабленным иммунитетом. Мышам, имеющим MCF-7 опухоли, одновременно вводили таблетку 17β-эстрадиола с медленным высвобождением, имплантируемую подкожно. Мышей рандомизированно распределяли по группам испытания, когда средний объем опухоли достигал около 100 мм³. ADC или контроли вводили интраперитонеально один раз. Объем опухоли как функцию времени определяли с использованием формулы $(L \times W^2)/2$. Животных умерщвляли, когда объем опухолей достигал 1000 мм³. Для мышей, показывающих продолжительную регрессию, завершали испытание примерно в день 100 после имплантации.

Начальные исследования осуществляли при введении 2 мг/кг (разовая доза) каждого ADC для L540cy модели (фиг. 1) и при 0,6 мг/кг (разовая доза) для Karpas-299 модели (фиг. 2). Графики, показывающие изменение объема опухоли в динамике по времени показаны на фиг. 1 и 2. Все лекарственные средства-линкеры были конъюгированы через их межцепевые тиолы с химерным cAC10 антителом, описанным в Патенте США № 7090843, который включен в настоящую заявку посредством ссылки, при средней нагрузке лекарственным средством 8 групп лекарственного вещества на антитело. В обеих моделях, ADC, полученные с 1 (cAC10-nc-PAB(gluc), непегилированный) и 10 (Пегилированная конструкция на схеме 2), вылечивали всех животных (5/5) в их группах дозирования, тогда как ADC, полученный с 4, не оказывал никакого лечебного действия, а только вызывал незначительное замедление роста опухоли. Пониженная активность cAC10-4 согласуется с его сильно пониженной экспозицией, наблюдаемой в фармакокинетическом исследовании, как показано на фиг. 7. Предполагали, что фармакокинетически-контролируемые отличия в активности также могут наблюдаться между cAC10-1 и cAC10-10, но что потребуются более низкие дозы. Соответственно, испытания повторяли с обеими моделями при уровнях доз $1/2$ и $1/2$ от доз, используемых в начальных испытаниях. Для L540cy, доза 1 мг/кг обеспечивала полное вылечивание (6/6) для cAC10-10 и только 2/6 вылечивание для cAC10-1 (фиг. 3). При дозе 0,5 мг/кг никакого вылечивания не наблюдали ни в какой группе; однако cAC10-10 обеспечивал более длительное

замедление роста опухоли, чем сАС10-1 (фиг. 3). При обоих уровнях доз, L540су противоопухолевая активность соединения сАС10-10 была выше, чем у сАС10-1, что согласуется с их соответствующими фармакокинетическими свойствами. Для Каграс-299, доза 0,3 мг/кг обеспечивала б/б вылечивание для сАС10-10 и 5/6 вылечивание для сАС10-1 (фиг. 4). При 0,15 мг/кг, 5/6 вылечивание наблюдали для сАС10-10 и только 2/6 вылечивание для сАС10-1 (фиг. 4). Таким образом, для Каграс-299, более высокую противоопухолевую активность наблюдали при более низких уровнях доз для сАС10-10, при этом оба ADC продемонстрировали высокие показатели эффективности лечения выше этого уровня.

Схемы 3 и 4 описывают синтез аналогов непегилированного линкера 1 и пегилированного линкера 10, соответственно, включающего группу Na-малеимида-диаминопропионовой (MDpr) кислоты в качестве точки конъюгации. Эти два линкера были оценены в моделях Каграс299 ALCL и Ramos лимфомы Беркитта. Для Каграс299, сАС10 конъюгаты 14 (непегилированный) и 16 (параллельное пегилирование) вводили один раз при 0,2 мг/кг и наблюдали одинаковое замедление роста опухоли (фиг. 5). В отличие от этого в Ramos модели, hBU12-16 показал более высокую противоопухолевую активность по сравнению с hBU12-14 при двух разных дозах. После разовой дозы 2 мг/кг hBU12-16 обеспечивал 5/5 вылечивание по сравнению с показателем 0/5 для hBU12-14 (фиг. 6).

Пример 10. Синтез mDPR-cys(StBu)-ПЭГ₂₋₃₆-ОН каркаса для конъюгации и mDPR-cys(StBu)-ПЭГ₄₈₋₇₂-ОН каркаса для конъюгации

Схема 7. Синтез MDpr-Cys (StBu)-ПЭГ₂₋₃₆-ОН

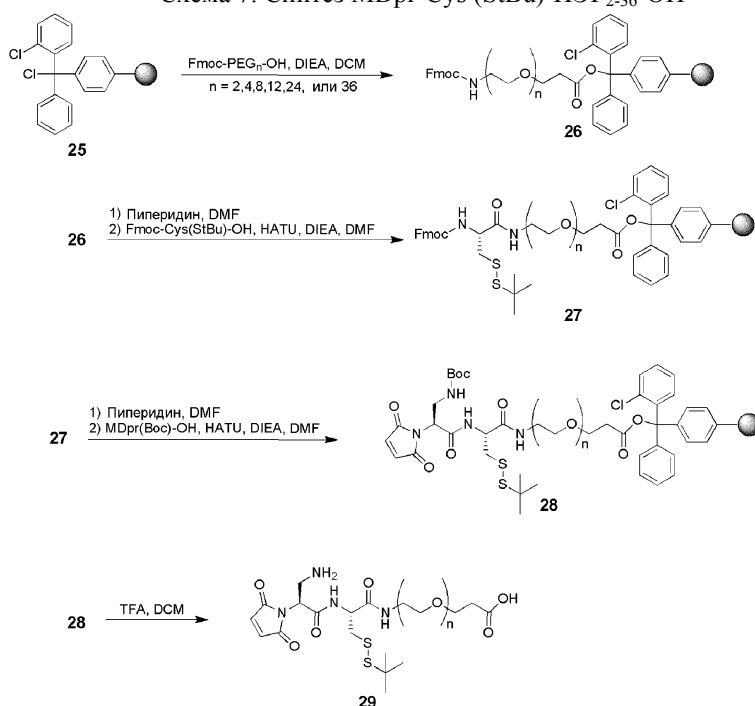
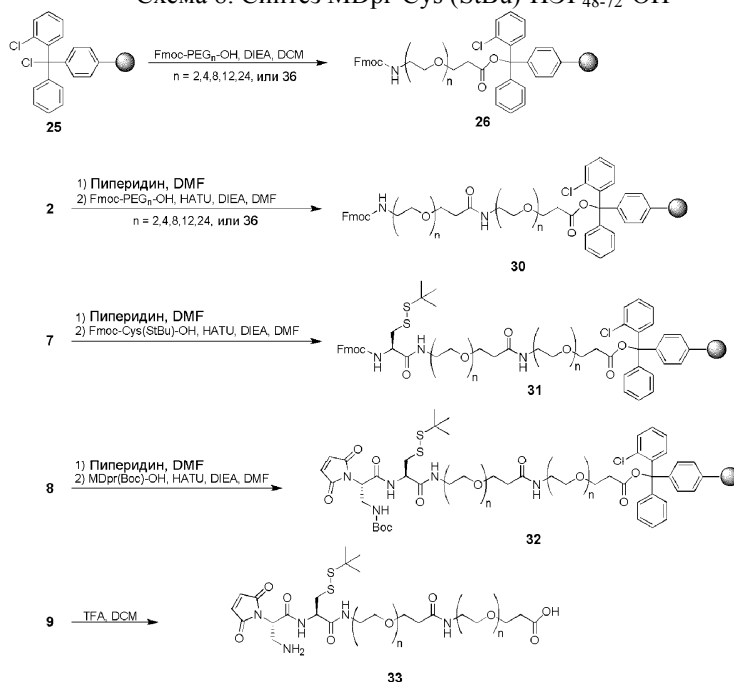


Схема 8. Синтез MDpr-Cys (StBu)-ПЭГ₄₈₋₇₂-ОН

Загрузка 2-хлортритил-хлоридной смолы:

В полипропиленовый шприц, снабженный пористым полипропиленовым диском, загружали 2-хлортритил-хлоридную смолу. В шприц набирали раствор Fmoc-ПЭГ_n-ОН (1 экв.) и DIEA (1 экв.) в безводном DCM (10 мл/грамм смолы). Шприц закрывали резиновой пробкой и встряхивали в течение 5 мин, затем добавляли дополнительное количество DIEA (1,5 экв.). После встряхивания еще в течение 30 минут в шприц набирали MeOH (по меньшей мере 0,8 мл/г смолы) для гашения непрореагировавшей смолы. После встряхивания в течение 5 мин раствор выпускали из шприца и смолу промывали DMF (6×5 мл), DCM (6×5 мл) и диэтиловым эфиром (6×5 мл). Смолу сушили в условиях вакуума.

Загрузка амидной смолы Ринка: К раствору Fmoc-защищенного ПЭГ или аминокислоты (4 экв.) в безводном DMF (10 мл/грамм смолы) добавляли HATU (4 экв.) и DIEA (8 экв.). Раствор встряхивали в течение 5 минут и забирали в полипропиленовый шприц, снабженный пористым полипропиленовым диском с нагрузкой амидной смолой Ринка. Реакционную смесь встряхивали минимум в течение 2 ч и завершение реакции подтверждали при помощи теста Кайзера. Смолу промывали DMF (6×5 мл), DCM (6×5 мл) и диэтиловым эфиром (6×5 мл) и сушили в условиях вакуума.

Снятие Fmoc-защиты: Fmoc-ПЭГ_n-2-хлортритильную смолу в полипропиленовом шприце, снабженном пористым полипропиленовым диском, оставляли для разбухания в течение 30 минут с DCM (10 мл/грамм смолы). DCM выпускали из шприца и смолу промывали при помощи DMF (6×5 мл). Смолу промывали раствором 20% пиперидина в DMF (3×2 мин и 1×60 мин) при встряхивании. Завершение реакции подтверждали при помощи теста Кайзера и полученную смолу с удаленной Fmoc-защитой промывали DMF (6×5 мл), DCM (6×5 мл) и диэтиловым эфиром (6×5 мл) и сушили в условиях вакуума.

Связывание с аминокислотой:

К раствору Fmoc-защищенной ПЭГ кислоты, аминокислоты или MDpr(Boc)-ОН (3 экв.) в безводном DMF (10 мл/грамм смолы) добавляли HATU (3 экв.) и DIEA (6 экв.). Раствор встряхивали в течение 5 мин и забирали в полипропиленовый шприц, содержащий аминокислотную 2-хлортритил-смолу с удаленной Fmoc-защитой. Реакционную смесь встряхивали минимум в течение 2 часов и завершение реакции подтверждали при помощи теста Кайзера. Смолу промывали DMF (6×5 мл), DCM (6×5 мл) и диэтиловым эфиром (6×5 мл) и сушили в условиях вакуума.

Удаление IvDde защитной группы:

Для удаления IvDde защитной группы пептидную смолу промывали раствором 2% гидразина в DMF (2×30 мин) при встряхивании. Завершение реакции подтверждали при помощи теста Кайзера и полученную смолу без IvDde-защиты промывали DMF (6×5 мл), DCM (6×5 мл) и диэтиловым эфиром (6×5 мл) и сушили в условиях вакуума.

Расщепление пептида-смолы:

Конечные пептиды отщепляли от смолы путем обработки при помощи TFA в DCM (30% об/об для 2-хлортритильной смолы или 95% об/об для амидной смолы Ринка) в течение 15 мин. После расщепления раствор оставляли еще на 60 мин, чтобы убедиться в полном удалении защитной группы Boc из MDpr остатка. Полученный раствор упаривали под потоком азота и полученные пептиды анализировали при помощи ЖХ-МС. Пептиды либо использовали неочищенными, либо очищали препаративной обра-

шенно-фазовой ВЭЖХ с последующим осуществлением ЖХ-МС анализа.

Пример 11. Конъюгация пегелированного каркаса с антителом и лекарственным средством-линкером.

Схема 9. Конъюгация пегелированного каркаса с полностью восстановленными межцепевыми дисульфидами антитела

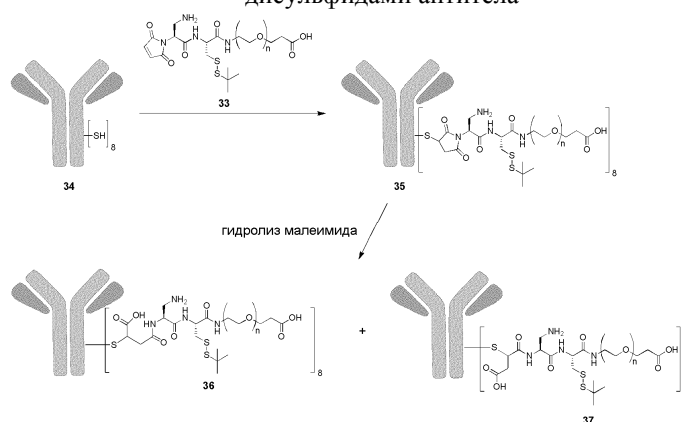


Схема 10. Удаление защиты пегелированных каркасов для конъюгации

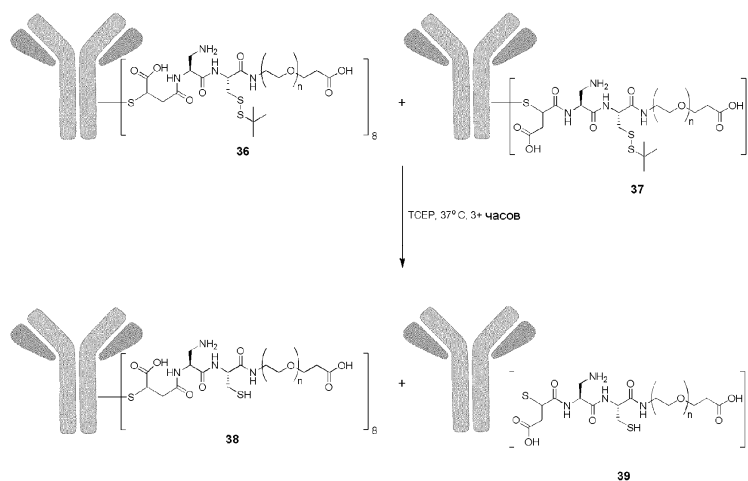
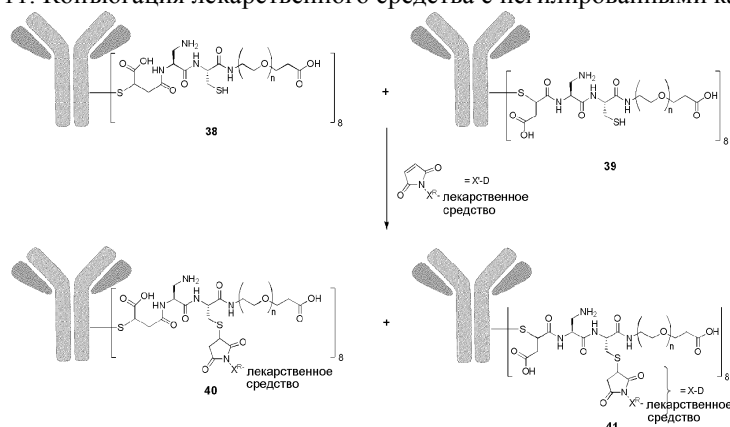


Схема 11. Конъюгация лекарственного средства с пегелированными каркасами



где X^R представляет собой остальную часть предшественника высвобождаемой комплексной группы X' в $X'-D$ части или остальную часть высвобождаемой комплексной группы X в $-X-D$ части.

Полное восстановление межцепевых дисульфидных связей антитела:

К раствору антитела при концентрации приблизительно 10 мг/мл в PBS, содержащем диэтилен-триаминпентауксусную кислоту (1 мМ) и забуференном дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 12 экв. трис(2-карбоксиил)-фосфина (ТСЕР). Раствор подвергали вихревому перемешиванию и инкубировали при 37°С в течение 1 ч. Полное восстановление межцепевых дисульфидных связей подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество ТСЕР, если восстановление было неполным. После восстановления раствор антитела обессоливали в PBS, содержащем 2 мМ EDTA, с использованием 3 циклов разведения и центрифугирования при 4000 ×g через 30 кДа MWCO фильтр. Полученное полностью восстановленное антитело 34 фильтровали через сте-

рильный 0,22 мкм центрифужный фильтр и использовали сразу или хранили при -80°C .

Конъюгация малеимид-содержащего пегелированного каркаса:

К раствору полностью восстановленного антитела (34) при концентрации приблизительно 10 мг/мл в PBS, содержащем EDTA (2 мМ) и забуференном дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 12 молярных эквивалентов MDpg-ПЭГ_n-ОН из 5-20 мМ DMSO исходного раствора. Полученный раствор оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин. Полную конъюгацию подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество ПЭГ реагента, если конъюгация была неполной. После конъюгации раствор антитела обессоливали в PBS с использованием 3 циклов разведения и центрифугирования при $4000\times g$ через 30 кДа MWCO фильтр. Полученный раствор пегелированного антитела (36 и 37) фильтровали через стерильный 0,22 мкм центрифужный фильтр и использовали сразу или хранили при -80°C .

Удаление трет-бутилтиольных защитных групп из пегелированного каркаса для конъюгации:

К раствору пегелированного антитела (36 и 37) при концентрации приблизительно 10 мг/мл в PBS, содержащем диэтилэтриаминапентауксусную кислоту (1 мМ) и забуференном дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 20-30 эквивалентов TCEP. Раствор подвергали вихревому перемешиванию и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Полное удаление трет-бутилтиольных защитных групп подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество TCEP и продолжали инкубацию при 37°C , если восстановление было неполным.

После восстановления раствор антитела обессоливали в PBS, содержащем 2 мМ EDTA, с использованием 3 циклов разведения и центрифугирования при $4000\times g$ через 30 кДа MWCO фильтр. Полученный раствор незащищенного пегелированного антитела (38 и 39) фильтровали через стерильный 0,22 мкм центрифужный фильтр и использовали сразу или хранили при -80°C .

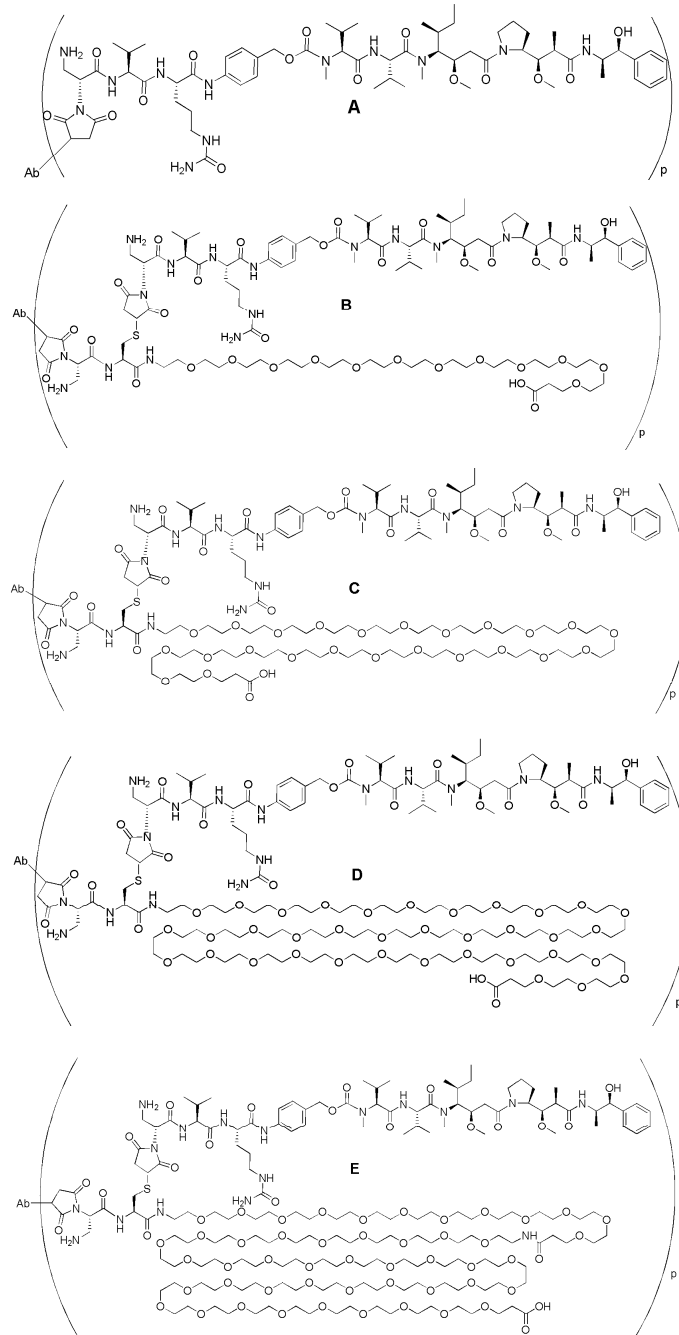
Конъюгация малеимидсодержащих соединений лекарственное средство-линкер:

К раствору незащищенного пегелированного антитела (38 и 39) при концентрации приблизительно 10 мг/мл в PBS, содержащем EDTA (2 мМ) и забуференном дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 12 мол. Экв. в малеимидсодержащего лекарственного средства-линкера из 5-20 мМ DMSO исходного раствора. Полученный раствор оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин. Полную конъюгацию подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество лекарственного средства-линкера, если конъюгация была неполной. После конъюгации раствор антитела обессоливали в PBS с использованием 3 циклов разведения и центрифугирования при $4000\times g$ через 30 кДа MWCO фильтр. Полученный раствор пегелированного конъюгата антитело-лекарственное средство (40 и 41) фильтровали через стерильный 0,22 мкм центрифужный фильтр, анализировали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) и хранили при -80°C .

Пример 12: ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, показали низкие уровни агрегации SEC анализ конъюгатов: Антитело, ADC, из образцов пегелированных ADC (50 мкг) разбавляли до 1 мг/мл в PBS и вводимые пробы с объемом 30 мкл хроматографировали на колонке для аналитической SEC (TOSOH TSK-гель G3000SW_{XL}, 7,8 мм в.д. \times 30 см, 5 мкм) с использованием ВЭЖХ системы Waters 2695. Образцы элюировали изократически с использованием 92,5% 25 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 350 мМ NaCl и 7,5% изопропилового спирта, при скорости потока 1 мл/мин.

Для исследования эффекта длины ПЭГ на ADC агрегацию, sAC10-MDpg-vcMMAE ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества на антитело были получены с или без пегелированных конъюгируемых каркасов, сформированных с использованием ПЭГ групп разного размера. SEC результаты показаны на фиг. 8. Без включения пегелированного конъюгируемого каркаса (sAC10-A) агрегация ADC была на уровне 10,4%. Добавление пегелированного каркаса обеспечивает ADCs с более низкими уровнями агрегации. Агрегация снижалась с увеличением длины ПЭГ вплоть до ПЭГ₃₆ (sAC10-D), где пик агрегата составлял 2,0% от общего сигнала. В случае sAC10-MDpg-vcMMAE, ПЭГ группы длиной больше чем ПЭГ₃₆ (sAC10-D - sAC10-G) не приводили к дальнейшему уменьшению агрегации.

Структуры соединений лекарственное средство-линкер, включенных в SEC исследование: ADCs конъюгировали с антителом через межцепевые тиолы. Антитело-замещенные сукцинимиды могут существовать в их гидролизованных формах (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе C-N связи сукцинимиды).



Пример 13. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, демонстрируют *in vitro* активность аналогичную их непегилированным аналогам. *In Vitro* цитотоксичность ADC, полученных с пегилированными конъюгированными каркасами ADCs на основе MDpr-vcMMAE, направленные на CD30, были получены с и без добавления пегилированного каркаса для конъюгации. Конъюгаты соединений А (непегилированное), В (ПЭГ₁₂), С (ПЭГ₂₄) и D (ПЭГ₃₆) испытывали против CD30-положительных клеточных линий Karpas 299 и L540су. Включение ПЭГ и увеличивающаяся длина ПЭГ приводили к незначительной разнице в *in vitro* цитотоксичности (табл. 3). Контрольные ADCs (непегилированные и пегилированные), полученные с н-этиламиноmaleимидом (NAEM) вместо MDpr-vcMMAE (сAC10-H, сAC10-I и сAC10-J), не показали никакой активности в этом анализе, и это свидетельствует о том, что пегилированные каркасы не способствуют *in vitro* цитотоксичности.

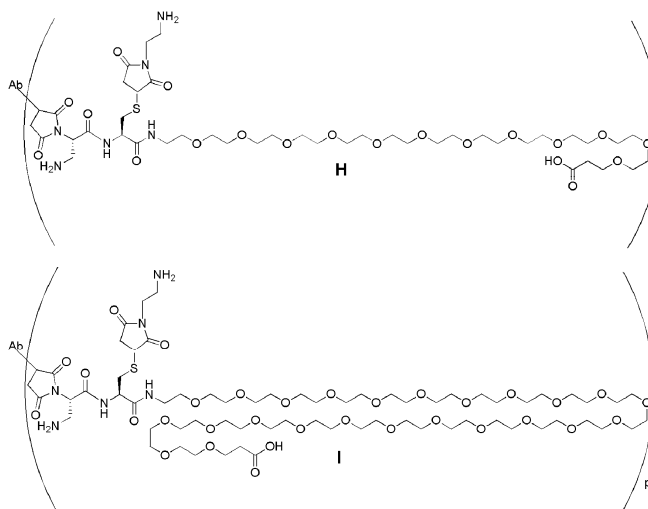
Таблица 3. In vitro цитотоксическая активность анти-CD30 ADC, полученных с пегилированными конъюгированными каркасами; значения представляют собой IC₅₀ значения в нг/мл

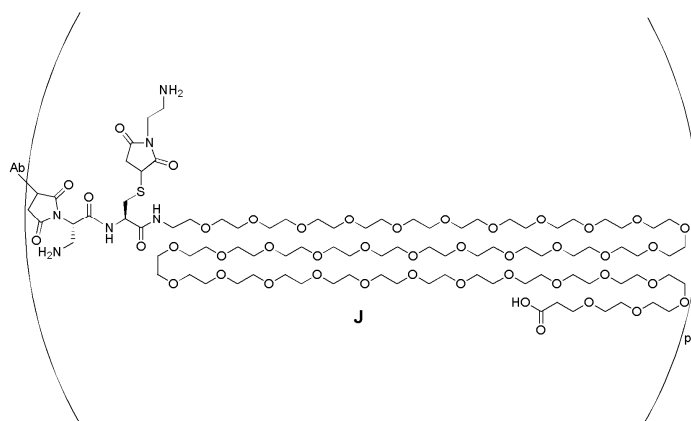
ADC	Количество групп лекарственного вещества/Ab	CD30+ клеточные линии	
		Karpas 299	L540cy
cAC10-A	8	1,7	5,6
cAC10-B	8	2,2	5
cAC10-C	8	4,2	5,5
cAC10-D	8	4,3	4
cAC10-NAEM	8	Отсутствие эффекта	Отсутствие эффекта
cAC10-H	8	Отсутствие эффекта	Отсутствие эффекта
cAC10-I	8	Отсутствие эффекта	Отсутствие эффекта
cAC10-J	8	Отсутствие эффекта	Отсутствие эффекта

При сравнении с непегилированным конъюгатом cAC10-A, имеющим нагрузку лекарственным средством равную 4, конъюгат cAC10-A с нагрузкой лекарственным средством равной 8 имел 2-4X in vitro цитотоксичность против Karpas 299 и L540cy; однако ADC с нагрузкой 8 не превосходил по своему действию ADC с нагрузкой 4 в in vivo моделях ксенотрансплантата из-за более быстрого клиренса ADC с нагрузкой 8 (см. пример 14).

ПЭГ₂₄ cAC10 конъюгат, cAC10-10, содержащий -X-D группу, включающую mс-РАВА(gluc)-ММАЕ, который был получен из промежуточного соединения линкер-лекарственное средство примера 2 и содержит ПЭГ₂₄ группу в параллельной ориентации (лекарственное средство/Ab=8) относительно лекарственного средства, также имел более высокую активность в моделях ксенотрансплантата по сравнению с соответствующими имеющими нагрузку 8 непегилированными ADC (cAC10-1) и имеющими нагрузку 8 ADC, содержащими ПЭГ₂₄ группу в последовательной ориентации (cAC10-4), последний из которых был получен из промежуточного соединения Линкер-Лекарственное средство примера 1 (см. фиг. 1 и 2).

NAEM блокированные каркасы для конъюгации, используемые в качестве контролей: ADCs конъюгируют с антителом через межцепевые тиолы. Антитело-замещенные сукцинимиды могут существовать в их гидролизованых формах (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе C-N связи сукцинимиды).

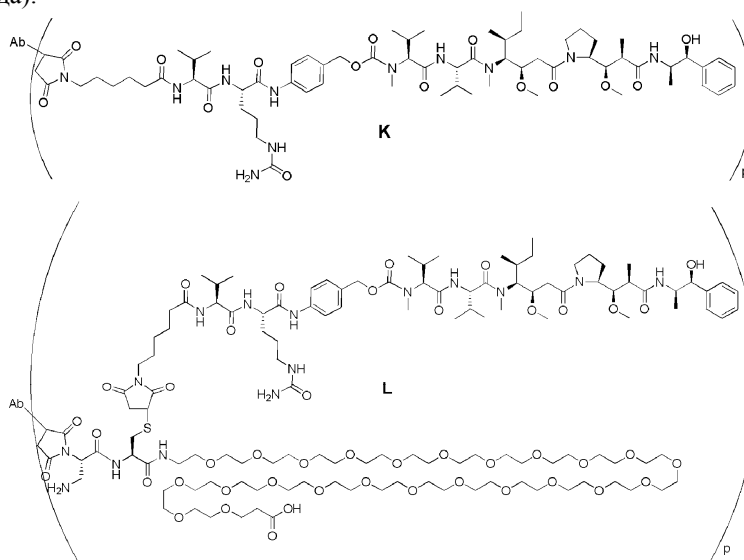




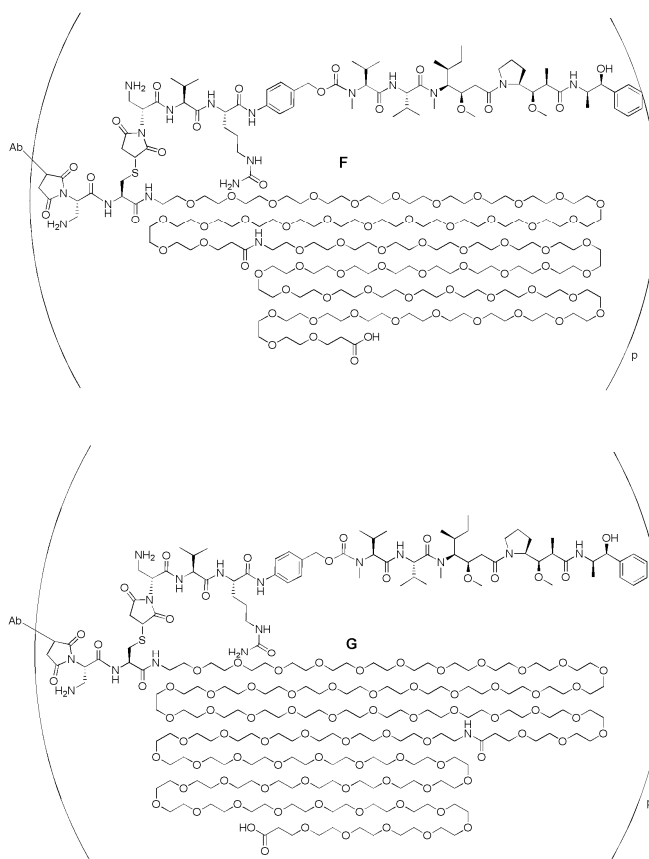
Пример 14. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, имели лучшую фармакокинетику по сравнению с ADC, не содержащими ПЭГ

Мышам вводили разовую в/в дозу 3 мг/кг каждого ADC с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/mAb. Как и следовало ожидать, непегилированные ADC, полученные либо с mc-vcMMAE (K) либо с MDrg-vcMMAE (A), выводились из системы кровообращения намного быстрее, чем контрольный конъюгат, полученный с NAEM. Соответствующие пегилированные ADC C и L показали улучшенные фармакокинетические свойства, т.е. более медленный клиренс (фиг. 9).

Дополнительные соединения, включенные в фармакокинетические исследования на мышах - ADCs конъюгируют с антителом через межцепевые тиолы. Антитело-замещенные сукцинимиды могут существовать в их гидролизованном виде (т.е. молекула воды присоединяется через одну, а не через обе C-N связи сукцинимиды).



Во втором эксперименте мышам вводили разовую в/в дозу 3 мг/кг каждого ADC с нагрузкой 8 лекарственных групп/mAb. Как и в описанном выше примере (фиг. 9), ADC, полученный с непегилированным MDrg-vcMMAE A, показал ускоренный клиренс из системы кровообращения (фиг. 10). Три ADC, полученные с пегилированными конъюгированными каркасами B, C и D, показали улучшенный клиренс (фиг. 10). В этом анализе ADC, полученные с варьируемой длиной ПЭГ, ПЭГ₁₂ (B), ПЭГ₂₄ (C) и ПЭГ₃₆ (D), показали незначительные отличия друг от друга. Как можно было предположить, контрольные конъюгаты, полученные из NAEM-блокированных пегилированных каркасов (H, I и J), показали фармакокинетику, близко совпадающую с NAEM-кэпированным антителом (фиг. 10).



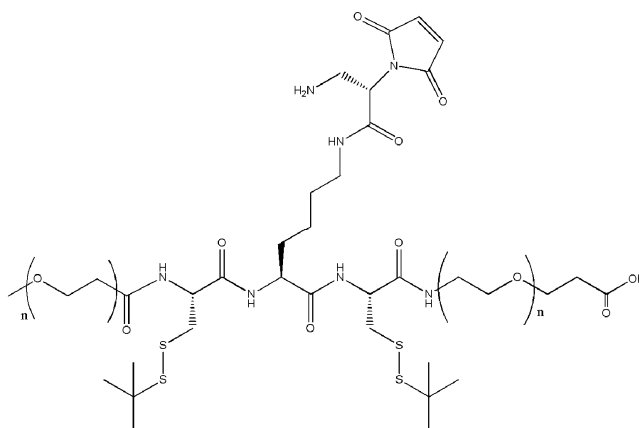
Пример 15. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации, показали улучшенную фармакокинетику по сравнению с ADC, не содержащими ПЭГ

ADCs на основе sAC10, полученные с (B, C и D) и без (A) пегилированными конъюгированными каркасами, анализировали в L540su модели ксенотрансплантата. Животным вводили 2 мг/кг (разовая доза) каждого ADC и объем опухоли измеряли в динамике по времени. Объем опухоли у необработанных животных достигал 1000 мм^3 в день 25 испытания. ADC, полученный с непегилированным соединением лекарственное средство-линкер (A), вылечивал 2 из 5 мышей, при среднем времени 57,3 дней для достижения объемов опухолей 1000 мм^3 у невылеченных животных (фиг. 11). ADC, полученный с пегилированным конъюгированным каркасом, объединенным с ПЭГ₁₂ (B), показал активность аналогичную активности ADC, полученному с A (фиг. 12). В этом случае вылечивали 1 из 5 животных, и в среднем требовалось 68,5 дней для достижения объемов опухолей 1000 мм^3 у невылеченных животных. ADC, полученный с ПЭГ₂₄-содержащим каркасом (C), показал улучшение по сравнению с A, вылечивая 4 из 5 мышей, при этом оставшаяся одна опухоль достигала объема 1000 мм^3 в день 53 (фиг. 13).

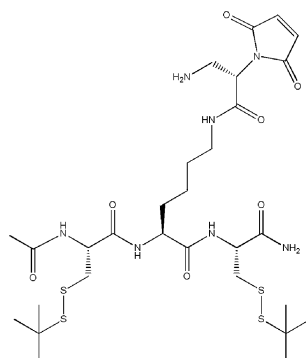
Во втором эксперименте, ADCs на основе hLIV22 (hLIV22 антитело описано в РСТ Публикации No. WO 2012/078688, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки), нацеленные на антиген карциномы молочной железы, LIV-1, были получены с mc-vcMMAE с (L) и без каркасов для конъюгации, получаемых с ПЭГ₂₄ (K). Животным вводили 3 мг/кг (разовая доза) каждого ADC. У необработанных животных в этом испытании среднее время для достижения объемов опухолей 1000 мм^3 составляло 39,2 дней. Обработка при помощи hLIV22-K увеличивала этот период до 57,6 дней, а пегилированный ADC hLIV22-L еще больше продлевал этот средний период времени до 71,4 дней (фиг. 14).

Пример 16. ADC, включающие ПЭГ в параллельной ориентации и 16 групп лекарственного вещества на антитело, демонстрировали меньшую агрегацию по сравнению с ADC, не содержащими ПЭГ

Для исследования эффекта ПЭГ на агрегацию ADCs с нагрузкой 16, были получены конъюгаты против трансферринового рецептора с использованием MDrg-глюкуронид-камптотетина в качестве -X-D группы. ADC были получены как имеющие стандартные нагрузки 8 (8 групп лекарственного вещества на антитело) или нагрузки 16 (16 групп лекарственного вещества на антитело) с или без включения ПЭГ группы. Конъюгацию осуществляли через межцепевые дисульфиды. Пегилированный и контрольный непегилированный каркасы для конъюгации (ПЭГ каркас A и контрольный каркас A соответственно), которые использовали для получения ADCs с нагрузкой лекарственным средством равной 16, представляют собой следующие



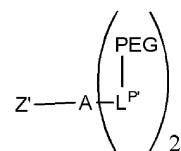
ПЭГ каркас А



Контрольный каркас А.

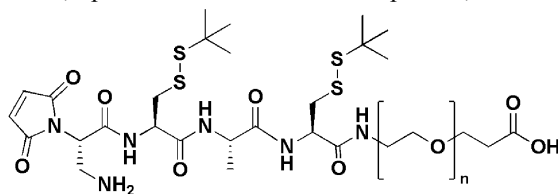
Конъюгаты антитела с лекарственным средством получали из ПЭГ каркаса А с $n=23$, который представляет собой иллюстративное промежуточное соединение лиганда и контрольного каркаса А, как описано в примере 11, путем (а) контактирования каркаса с антителом, содержащим тиольные группы, способные к сопряженному присоединению к maleимидной группе каркаса с образованием антитело-замещенных сукцинимидных групп, (b) удаления защитных групп тиола и (с) контактирование полученного продукта с -X-D группами, где X представляет собой высвобождаемую комплексную группу, состоящую из maleимидной группы и расщепляемой группы, где maleимидные группы из X-D способны взаимодействовать со свободными тиольными группами, полученными со стадии (b), путем сопряженного присоединения в подходящих условиях, что превращает maleимидные группы, присутствующие в X-D, в дополнительные замещенные сукцинимидные группы, избегая при этом преждевременного гидролиза сукцинимидных групп из каркаса и X-D, и (d) гидролиз совокупных замещенных сукцинимидов соединения линкер-лекарственное средство, полученных со стадии (с), путем присоединения молекулы воды через одну, а не обе C-N связи сукцинимиды для каждой из сукцинимидных групп, введенных из MDrg в качестве maleимидной группы.

ПЭГ каркас А охватывается формулой



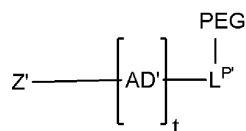
(т.е. формула VIIIb), где Z' представляет собой MDrg-содержащую группу, А представляет собой центральный лизиновый остаток и два L^p представляют собой фланкирующие цистеиновые остатки.

Другой подходящим образом защищенный каркас, который обеспечивает конъюгат с нагрузкой лекарственным средством равной 16, представляет собой ПЭГ каркас В, имеющий структуру



(ПЭГ каркас В), где n имеет значение 36.

ПЭГ каркас В охватывается формулой



(т.е. формула VIIIд), где Z' представляет собой MDrg группу, t имеет значение 1, и AD и L^P каждый представляют собой цистеиновые остатки.

Без включения пегилированного конъюгированного каркаса уровень агрегации ADC с нагрузкой равной 16 составлял 22%. Присоединение пегилированного каркаса, который содержит ПЭГ группу в параллельной ориентации относительно группы лекарственного средства снижало уровень агрегации до уровня при нагрузке 8, т.е. 2% агрегат.

Имеющие нагрузку 8 и пегилированные с нагрузкой 16 ADCs против трасферринового рецептора (сОКТ9), содержащие -X-D группу, состоящую из MDrg-РАВА(gluc)-Камптотецина, испытывали против панели Tfr⁺ раковых клеточных линий. В большинстве случаев, увеличение в два раза содержания лекарственного средства повышало эффективность ADC приблизительно в 2 раза. В некоторых случаях эффективность ADC повышалась в 3-10 раз или больше, даже если нагрузку лекарственным средством увеличивали только 2X. Наиболее примечательно, что имеющий нагрузку 16 конъюгат был активным против колоректальной клеточной линии HT-29 (Tfr копияность 23К) и клеточной линии меланомы SK-MEL-5 (Tfr копияность 21К), тогда как имеющий нагрузку 8 конъюгат считался неактивным (IC50 > 1 мкМ).

Пример 17. ADCs с нагрузкой 4 лекарственных групп на антитело с ПЭГ24 в параллельной ориентации демонстрируют более низкую активность *in vivo* по сравнению с их непегилированными аналогами.

Когда для ADC нагрузку лекарственным средством уменьшали до 4 лекарственных групп на антитело, было обнаружено, что конъюгаты, содержащие пегилированный глюкуроноид-ММАЕ линкер 10, обладают фармакокинетическими свойствами аналогичными свойствам непегилированного конъюгата, содержащего линкер 1. Соответственно, пегилирование не обеспечивало повышение активности в *in vivo* моделях ксенотрансплантата.

Анти-CD30 химерное антитело сАС10 конъюгировали с непегилированным линкером 1 или пегилированным линкером 10 при средней нагрузке 4 лекарственных групп/антитело и оценивали в моделях опухолей L540су лимфомы ходжкина и Кагрas 299 анапластической крупноклеточной лимфомы. Для L540су (фиг. 13), животным вводили разовую интраперитонеальную дозу ADC при 0,5 и 1 мг/кг. При более высокой дозе 1 мг/кг оба конъюгата пегилированный (сАС10-10) и непегилированный (сАС10-1) были одинаково эффективны, обеспечивая вылечение 5 из 6 мышей. Однако при более низкой дозе 0,5 мг/кг непегилированный линкер (сАС10-1) обеспечивал более продолжительное замедление роста опухоли с вылечением 2 из 6 мышей. При этом, пегилированный линкер (сАС10-10) был менее эффективен, и ни одна мышь не была вылечена. Аналогичные результаты были получены в Кагрas2 99 модели ксенотрансплантата (фиг. 16).

Эти данные говорят о том, что при отсутствии улучшения фармакокинетических свойств конъюгата, пегилирование 24 группами ПЭГ вызывает очень незначительное уменьшение активности *in vivo*. Это может быть результатом уменьшенного ферментативного высвобождения лекарственного средства или пониженной проницаемости из-за увеличения размера конъюгата в результате пегилирования.

Пример 18. ADCs, включающие пегилированные глюкуроноид-содержащие соединения лекарственное средство-линкер, демонстрируют *in vivo* активность, согласующуюся с фармакокинетическими свойствами конъюгата.

Для определения, существует ли оптимальный размер ПЭГ для комбинации глюкуроноида и ММАЕ, был получен и оценен ряд ПЭГх линкеров, охватывающий непегилированный, ПЭГ2, ПЭГ4, ПЭГ8, ПЭГ12, ПЭГ24 и разветвленный ПЭГ4-(ПЭГ4)₃. Непегилированные ADCs сАС10-14 и hBU12-14, представленные в табл. 4 и 5, соответственно, являются структурно схожими с пегилированными ADCs, но не содержат L^P группу, тогда как в случае пегилированных каркасов присутствует лизиновый остаток.

Начальные *in vitro* исследования продемонстрировали минимальный эффект размера ПЭГ на активность на большинстве испытываемых клеточных линий. Анти-CD30 и анти-CD19 антитела, сАС10 и hBU12, соответственно, конъюгировали при нагрузке 8 лекарственных групп/антитело и оценивали против панели клеточных линий лимфомы. Линии CD30-положительной L540су лимфомы и L428 лимфомы Ходжкина и Кагрas 299 анапластической крупноклеточной лимфомы были высокочувствительными ко всем сАС10 конъюгатам независимо от размера ПЭГ, как показано в табл. 4.

Таблица 4. In vitro цитотоксичность - α CD30 конъюгаты (IC_{50} в нг/мл)

ADC ^a	ПЭГх	CD30+ клеточные линии			CD30-
		Karpas 299	L540cy	L428	RL
cAC10-14	отсутствие ПЭГ	0,3	3	85	>1000
cAC10-43	ПЭГ2	0,3	2	10	>1000
cAC10-42	ПЭГ4	0,4	3	16	>1000
cAC10-18	ПЭГ8	0,3	2	18	>1000
cAC10-17	ПЭГ12	0,3	2	19	>1000
cAC10-16	ПЭГ24	0,4	3	8	>1000
cAC10-19	ПЭГ4- (ПЭГ4)3	0,1	1	8	>1000

^a ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab

Активность hBU12 (анти-CD19) конъюгатов, содержащих ПЭГх-глюкуронид-ММАЕ линкеры, которую определяли на панели клеточных линий не-ходжкинской лимфомы, была более изменчивой, как показано в табл. 5. Размер ПЭГ не имел никакого эффекта на активность ADC в клеточной линии Ramos лимфомы Беркитта. Однако оказалось, что активность конъюгата изменялась как функция размера ПЭГ в клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы SU-DHL-4, WSU-DLCL-2 и RL. При измерениях с определением значений IC_{50} , по-видимому, не было обнаружено взаимосвязи между размером ПЭГ и активностью. Однако при более тщательном исследовании кривых доза-ответ все-таки была обнаружена обратная зависимость между размером ПЭГ и максимальным ингибированием роста. Эти данные показаны на фиг. 17.

Таблица 5. In vitro цитотоксичность - α CD19 конъюгаты (IC_{50} в нг/мл)

ADC ^a	ПЭГх	CD19+ клеточные линии				CD19-
		Ramos	SU-DHL-4	WSU-DLCL-2	RL	L540cy
hBU12-14	отсутствие ПЭГ	2	22	5	61	>1000
hBU12-43	ПЭГ2	2	>1000	12	229	>1000
hBU12-42	ПЭГ4	3	>1000	5	>1000	>1000
hBU12-18	ПЭГ8	2	16	211	>1000	>1000
hBU12-17	ПЭГ12	2	>1000	129	>1000	>1000
hBU12-16	ПЭГ24	4	>1000	3	>1000	>1000
hBU12-19	ПЭГ4- (ПЭГ4)3	2	>1000	247	>1000	>1000

^a ADCs с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab

Фармакокинетические свойства конъюгатов, охватывающих серию ПЭГх, оценивали, как описано выше. Крысам вводили разовую внутривенную дозу 1 мг/кг конъюгата, состоящего из несвязывающегося гуманизированного IgG (h00), несущего MDPr-ПЭГх-глюкуронид-ММАЕ линкеры, с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab. Образцы плазмы получали в разных временных точках и общее количество циркулирующего антитела определяли, как указано выше. Клиренс антитела показал прямую зависимость от размера ПЭГ, как показано на фиг. 16. Пегилированные конъюгаты с ПЭГ8, ПЭГ12 и ПЭГ24 показали свойства выведения из кровотока близкие к "голому" антителу; тогда как более короткие ПЭГ и неpegилированные аналоги выводились более быстро из системы кровообращения.

ПЭГх линкеры оценивали in vivo в моделях ксенотрансплантата. Исследования осуществляли в моделях CD19-положительной RL диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и моделях CD30-положительной L540cy лимфомы Ходжкина. Анти-CD19 (hBU12) конъюгаты, охватывающие линкеры без ПЭГ, с ПЭГ4, ПЭГ8, ПЭГ12 и ПЭГ24, вводили один раз интраперитонеально при 1 и 3 мг/кг как только средний объем опухоли достигал 100 мм³; результаты для RL модели показаны на фиг. 17. При 1 мг/кг все группы показали только очень небольшое замедление роста опухоли, и не наблюдалось какой-либо существенной взаимосвязи между размером ПЭГ и активностью. При более высокой дозе 3 мг/кг

конъюгаты, вообще не содержащие ПЭГ и содержащие ПЭГ4, достигали замедления роста опухоли с увеличением опухоли примерно в день 35. В отличие от этого, конъюгаты с линкерами, несущими ПЭГ8, ПЭГ12 и ПЭГ24, достигали полной ремиссии при 3 мг/кг, при этом в ПЭГ24 группе у 1 из 5 мышей возобновлялся рост опухоли. Повышенная активность ПЭГ8, ПЭГ12 и ПЭГ24 при более высокой дозе по сравнению с ПЭГ4 и непегилированными аналогами согласуется с наблюдаемыми фармакокинетическими свойствами, фиг. 18.

Пример 19. Внутритропухолевая доставка ММАЕ согласуется с фармакокинетическими свойствами конъюгата.

Мышам с CD30-положительной L540су лимфомой Ходжкина, имеющим размер опухолей около 200 мм³, вводили разовую дозу 1 мг/кг сАС10 конъюгатов с нагрузкой 8 групп лекарственного вещества/Ab с mc-глюкуроид-ММАЕ (линкер 1), mc-Lys(ПЭГ24)глюкуроид-ММАЕ (линкер 10), малеимидо-ПЭГ24-глюкуроид-ММАЕ (линкер 4) или mDpr-Lys(ПЭГ24)-глюкуроид-ММАЕ (линкер 16). Опухоли брали для исследования через 3 дня после введения средства и внутритропухолевую концентрацию определяли методом масс-спектрометрии. В соответствии с фармакокинетическими свойствами конъюгатов, ADCs с ПЭГ24 в параллельной конфигурации (линкеры 10 и 16) доставляли существенно большее количество ММАЕ к опухоли по сравнению с непегилированным конъюгатом (сАС10-1), как показано на фиг. 20. Кроме того, конъюгаты, содержащие ПЭГ24 в качестве расширяющей группы в ряду между малеимидом и глюкуроидом (сАС10-4), доставляли в 4 раза меньше ММАЕ, чем аналог (сАС10-10). Наконец, включение mDPR малеимида (сАС10-16) еще более увеличивало доставку ММАЕ по сравнению с малеимидапроил-содержащим аналогом (сАС10-10).

Пример 20. ADCs с нагрузкой 8 лекарственных групп на антитело с пегилированными линкерами, которые сохраняют фармакокинетические свойства исходного антитела, лучше переносятся *in vivo* по сравнению с их аналогами с более короткими ПЭГ и непегилированными аналогами.

Valb/c мышам (n=3) интраперитонеально вводили разовую дозу 50 мг/кг конъюгата в день 0. Мышей наблюдали ежедневно на внешние признаки болезненности и измеряли массу тела; животных умерщвляли, если они теряли больше чем 20% массы тела или если их считали умирающими. Изменение массы тела по сравнению с днем 0 наносили на график как функцию времени, фиг. 21. Нанесение данных на график прекращали для каждой группы при умерщвлении по меньшей мере одного животного. Мыши, которым вводили конъюгаты, не содержащие ПЭГ (IgG-14 и -44), содержащие ПЭГ2 (IgG-43) и ПЭГ4 (IgG-42), продемонстрировали существенную потерю массы тела или внешние признаки токсичности, и их умерщвляли между днями 5 и 7. В отличие от этого, мыши, получавшие конъюгаты, содержащие ПЭГ8 (IgG-18), ПЭГ12 (IgG-17) и ПЭГ24 (IgG-16), демонстрировали минимальную потерю массы тела и никаких внешних признаков агонии. Эти данные, вместе с фармакокинетическими профилями, показанными на фиг. 18, говорят о том, что конъюгаты с пониженной фармакокинетической экспозицией показали более высокую острую токсичность.

Пример 21. Максимальное увеличение длины ПЭГ

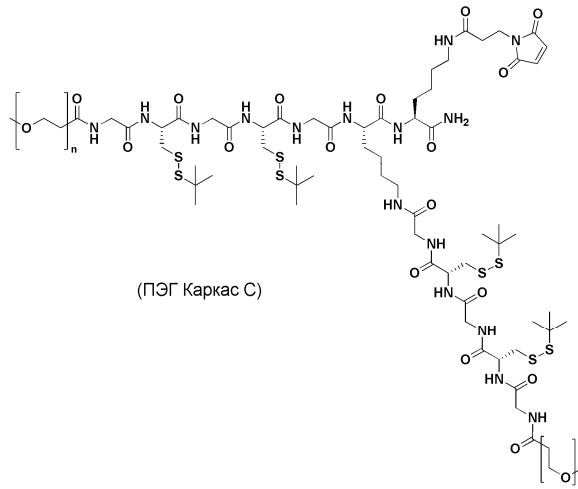
По мере увеличения длины ПЭГ цепи на лекарственном средстве-линкере, общий размер и гидродинамический радиус конъюгата также будет увеличиваться. Это проиллюстрировано на фиг. 22, которая показывает данные аналитической эксклюзионной хроматографии, показывающие следовые количества ADCs, полученных с соединениями лекарственное средство-линкер 18, 17 и 16, содержащими 8, 12 и 24 ПЭГ звеньев соответственно. Из первых принципов, по мере увеличения видимого размера ADC, можно ожидать, что его способности к диффузионному переносу в *in vivo* системе будут снижаться. Это может иметь нежелательный эффект уменьшения скорости или степени, с которой ADC может проникать в солидную опухоль. Эту пониженную способность к диффузионному переносу также можно наблюдать в фармакокинетике в плазме путем подгонки данных к двух-компарментной модели, которая включает выражение в виде скорости для фаз дистрибуции и элиминирования. Фармакокинетические данные для ADC, полученных с соединениями лекарственное средство-линкер 18, 17 и 16 (содержащими 8, 12 и 24 ПЭГ групп, соответственно), собирали в течение 21 дня и подгоняли к двух-компарментной модели, и период полужизни для этих двух процессов (дистрибуции и элиминирования) показан на фиг. 23.

Исходя из этих данных очевидно, что увеличение ПЭГ цепи от 8 до 12 звеньев приводит к замедлению элиминации вещества из плазмы (увеличение $t_{1/2}$ приблизительно на 2 дня), но увеличение ПЭГ в два раза, от 12 до 24 звеньев, приводит к незначительному дополнительному улучшению фармакокинетических свойств. Наоборот, $t_{1/2}$ дистрибуции увеличивается почти линейно в этом диапазоне, таким образом, увеличение в два раза ПЭГ цепи от 12 до 24 звеньев почти удваивает полупериод, необходимый для дистрибуции в тканевом компартменте. Эти данные говорят о том, что 12 ПЭГ звеньев могут представлять собой оптимальную длину для этого соединения лекарственное средство-линкер, поскольку более крупные ПЭГ приводят к уменьшению скорости дистрибуции, не оказывая существенного влияния на скорость элиминации. Этот пример показывает как можно использовать фармакокинетические данные для выбора оптимального размера ПЭГ для любого конкретного лекарственного средства-линкера.

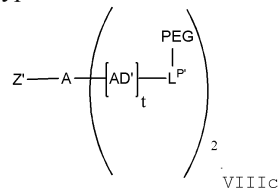
Пример 22. Получение мультиплексных пегилированных каркасов

Схемы 12-14 представляют синтез мультиплексных пегилированных каркасов А и В, которые обес-

печивают ADC, содержащие 16 лекарственных групп/антитело, и мультиплексного пегилированного каркаса C, структура которого показана ниже, с использованием способов пептидного связывания, описанных для пегилированных каркасов, обеспечивающих 4 и 8 лекарственных групп/антитело.



ПЭГ каркас C охватывается структурой



где Z' представляет собой маленимид-содержащую группу, A представляет собой разветвляющийся лизин-лизин остаток, t имеет значение 1, и каждый AD и каждый L^p представляет собой цистеиновый остаток.

Схема 12. Синтез MDpr-Cys(StBu)-Ala-Cys(StBu)-ПЭГ₃₆-OH (каркас B)

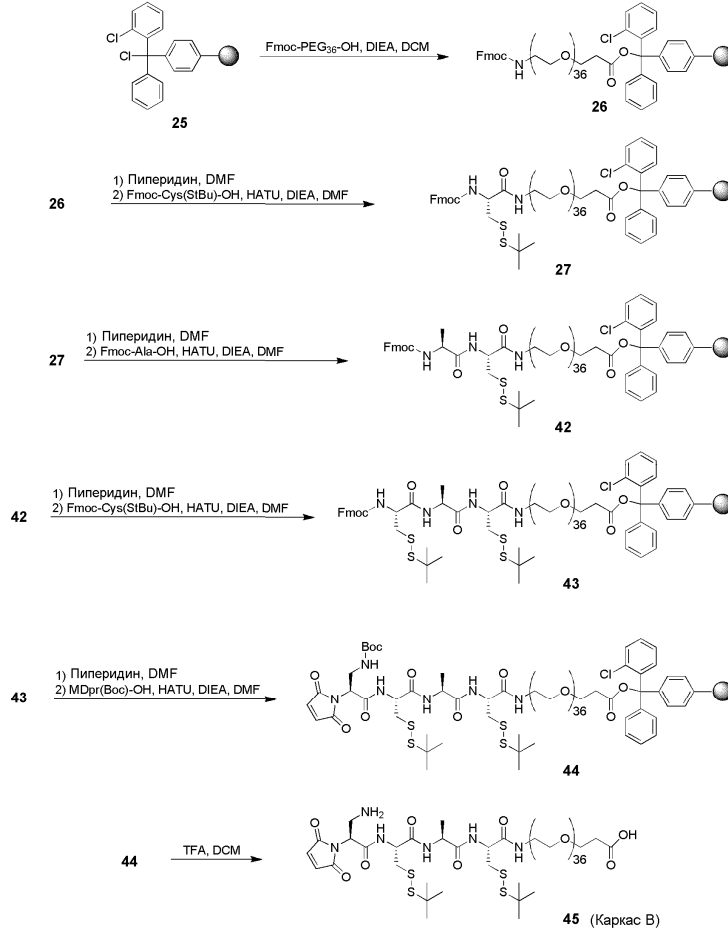


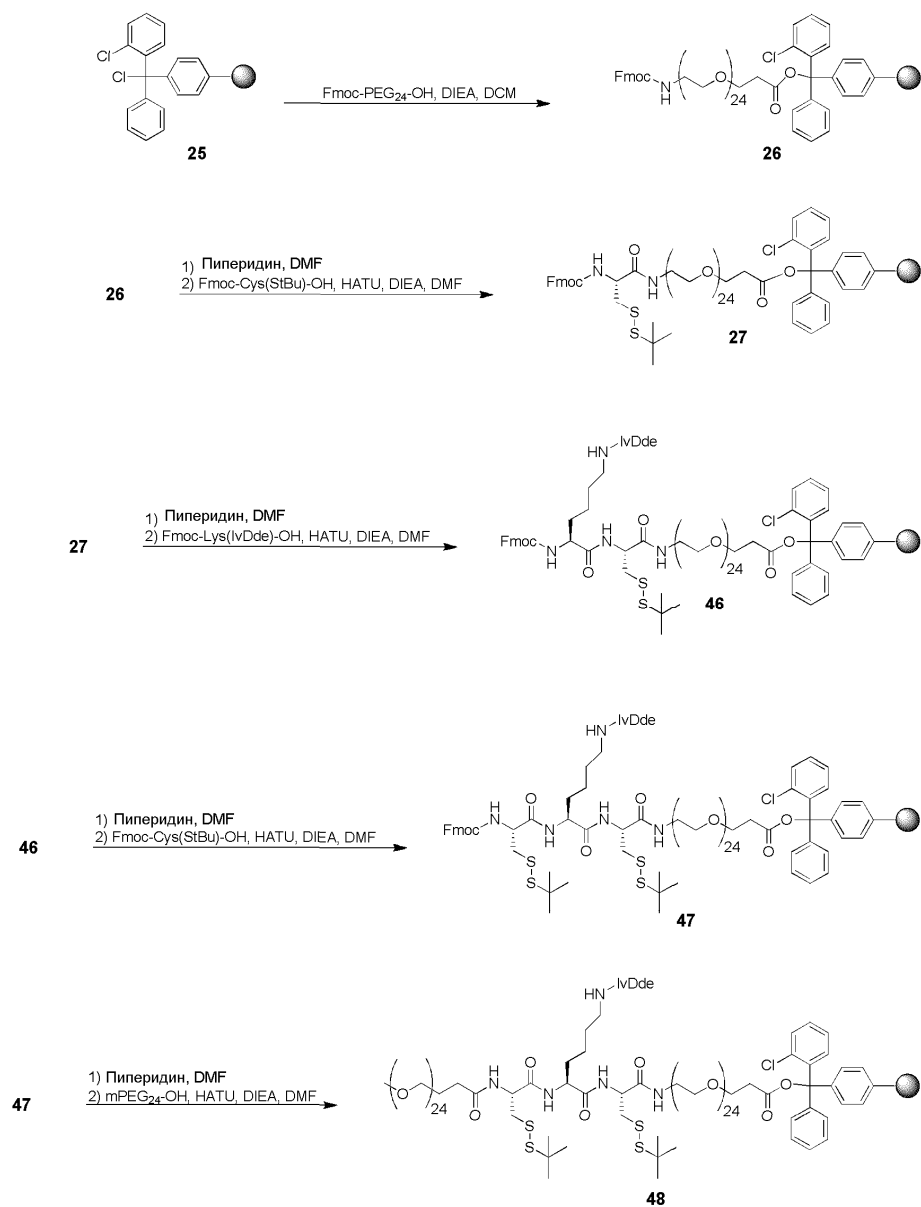
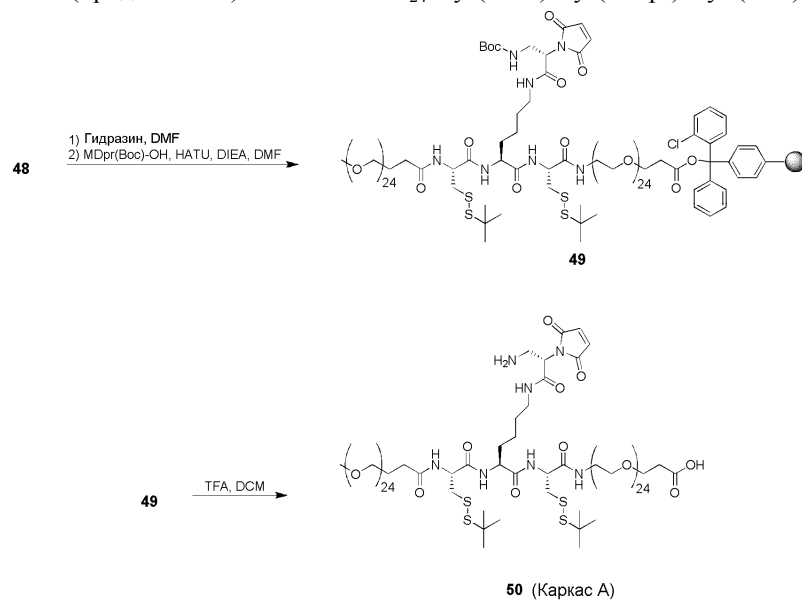
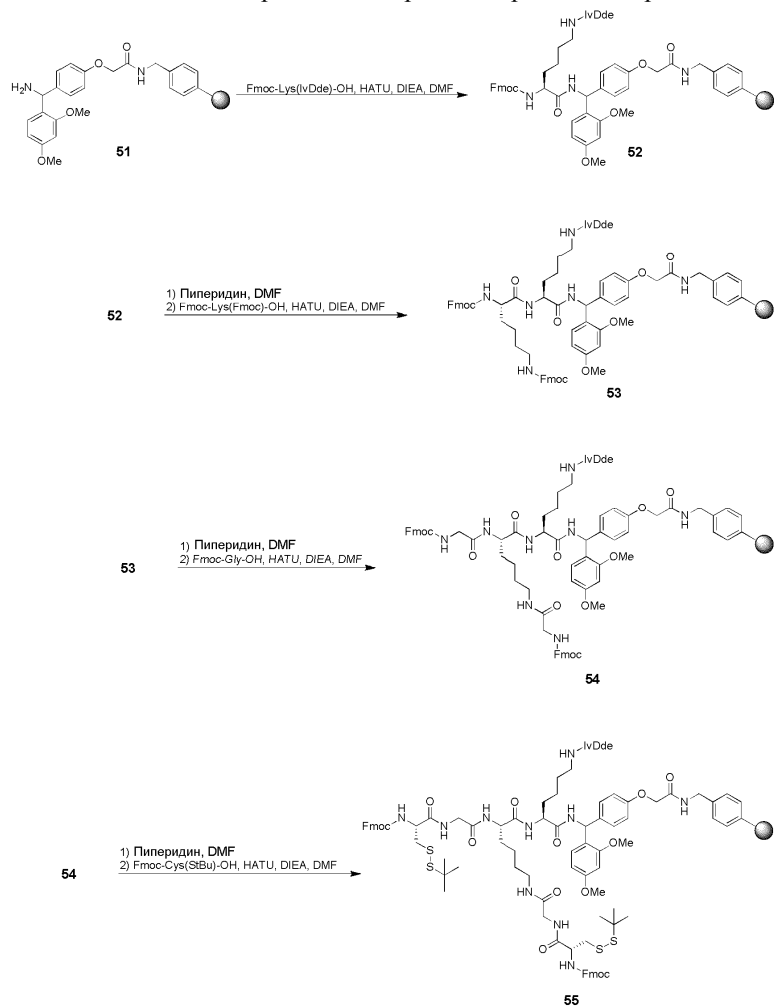
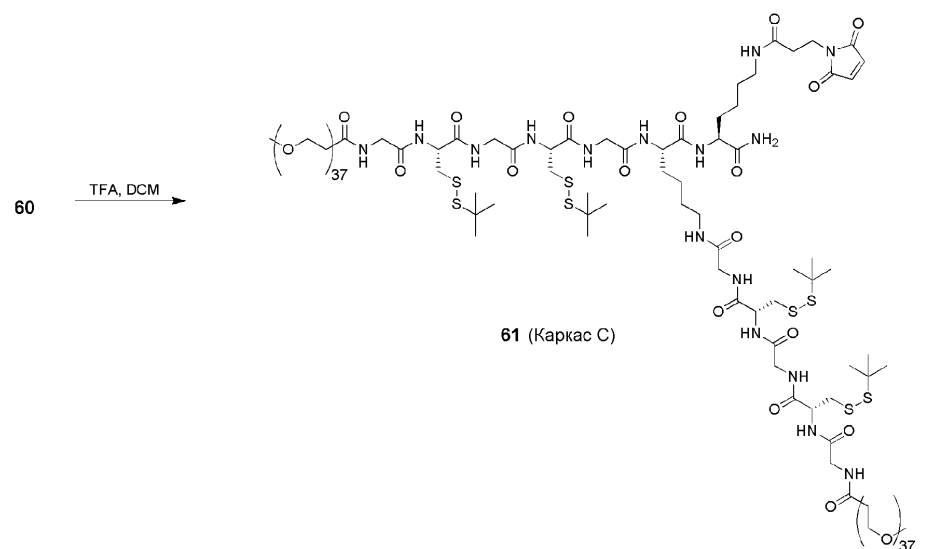
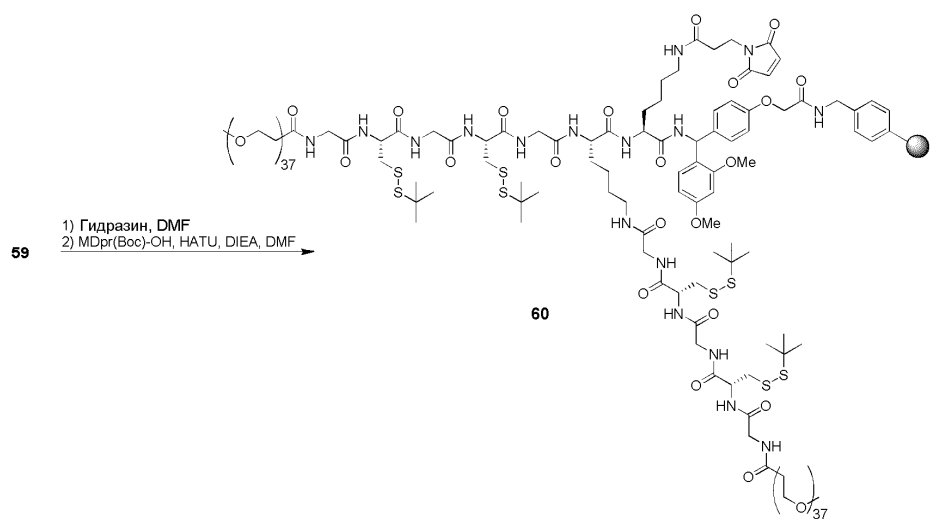
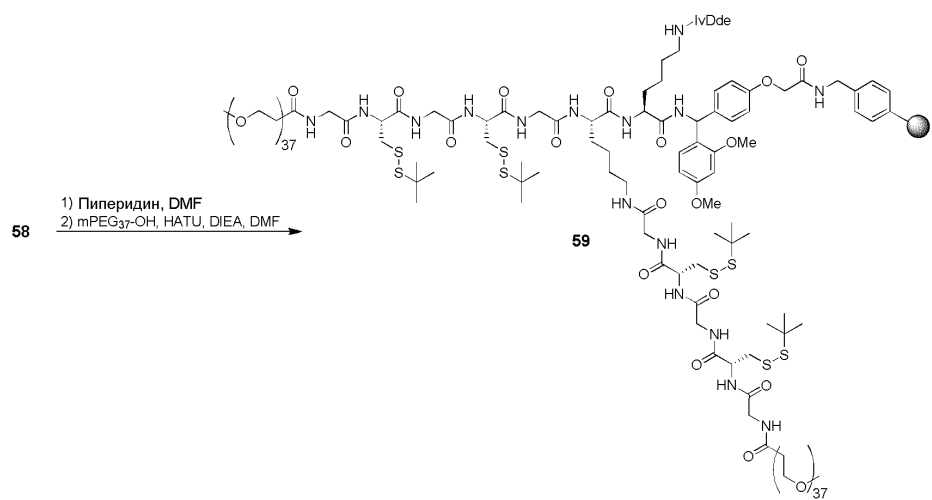
Схема 13. Синтез мПЭГ₂₄-Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(SBu)-ПЭГ₂₄-OH (каркас А)Схема 13 (продолжение). Синтез мПЭГ₂₄-Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(SBu)-ПЭГ₂₄-OH

Схема 14. Разветвленный пегилированный каркас лекарственное средство-носитель (каркас С)





MS данные для Каркасов А, В и С, полученных в соответствии со схемами 12-14, представлены в табл. 6

Таблица 6. Масс-спектрометрические данные для мультиплексных пегелированных каркасов

Пегелированный лекарственный каркас	Рассчитанная масса	Найденная масса
Разветвленный лекарственный каркас-носитель (Каркас С, где n=37)	4872,5	1624,92 как (M+3H)/3
MDPr-Cys (StBu)-Ala-Cys (StBu)-ПЭГ36-OH (Каркас В, где n=36)	2293,2	1147,85 как (M+2H)/2
mПЭГ ₂₄ -Cys (StBu)-Lys (MDPr)-Cys (StBu)-ПЭГ ₂₄ -OH (Каркас А где n=23)	2920,5	1461,32 как (M+2H)/2

Пример 23. Получение ADC, включающих мультиплексные пегелированные каркасы.

Схемы 15-16 показывают конъюгацию пегелированных каркасов с антителом и лекарственным средством-линкером. К раствору полностью восстановленного антитела (34) при концентрации приблизительно 10 мг/мл в PBS, содержащем EDTA (2 мМ) и забуференном дополнительном фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 12 молярных эквивалентов пегелированного разветвленного каркаса лекарственного средства-носителя из 5-20 мМ исходного раствора DMSO. Полученный раствор оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин. Полную конъюгацию подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество ПЭГ реагента, если конъюгация была неполной. После конъюгации раствор антитела вносили в колонку с насадкой 1 мл HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) с использованием шприцевого насоса и промывали при помощи 10 мл PBS, содержащего EDTA (2 мМ), при 1 мл/мин. Для удаления трет-бутилтиольных защитных групп колонку промывали при помощи 3 мл 10 мМ TCEP, забуференного дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), в течение 1 ч при 37°C. Колонку затем промывали при помощи 10 мл PBS, содержащего EDTA (2 мМ), при 1 мл/мин и очищенный конъюгат антитело-каркас элюировали при помощи 50 мМ глицина (pH 3,0). Содержащие белок фракции объединяли и нейтрализовали при помощи 10% (об/об) 800 мМ фосфата калия, 500 мМ NaCl и 500 мМ EDTA (pH 7,4). Полученный раствор (36) фильтровали через стерильный 0,22 мкм центрифужный фильтр и использовали сразу или хранили при -80°C.

К раствору незащищенного пегелированного антитела (35) при концентрации приблизительно 5 мг/мл в PBS, содержащем EDTA (2 мМ) и забуференном дополнительным фосфатом калия (100 мМ, pH 7,4), добавляли 48 молярных эквивалентов малеимид-содержащего лекарственного средства-линкера из 5-20 мМ исходного раствора DMSO. Полученный раствор оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин. Полную конъюгацию подтверждали обращенно-фазовой хроматографией. Добавляли дополнительное количество лекарственного средства-линкера, если конъюгация была неполной. После конъюгации раствор антитела обессоливали в PBS с использованием 3 циклов разведения и центрифугирования при 4000× g через 30 кДа MWCO фильтр. Полученный раствор пегелированного конъюгата антитело-лекарственное средство (37) фильтровали через стерильный 0,22 мкм центрифужный фильтр, анализировали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) и обращенно-фазовой хроматографии и хранили при -80°C.

Схема 15. Конъюгация малеимидсодержащего пегилированного разветвленного каркаса лекарственное средство-носитель и удаление трет-бутилтиольных защитных групп

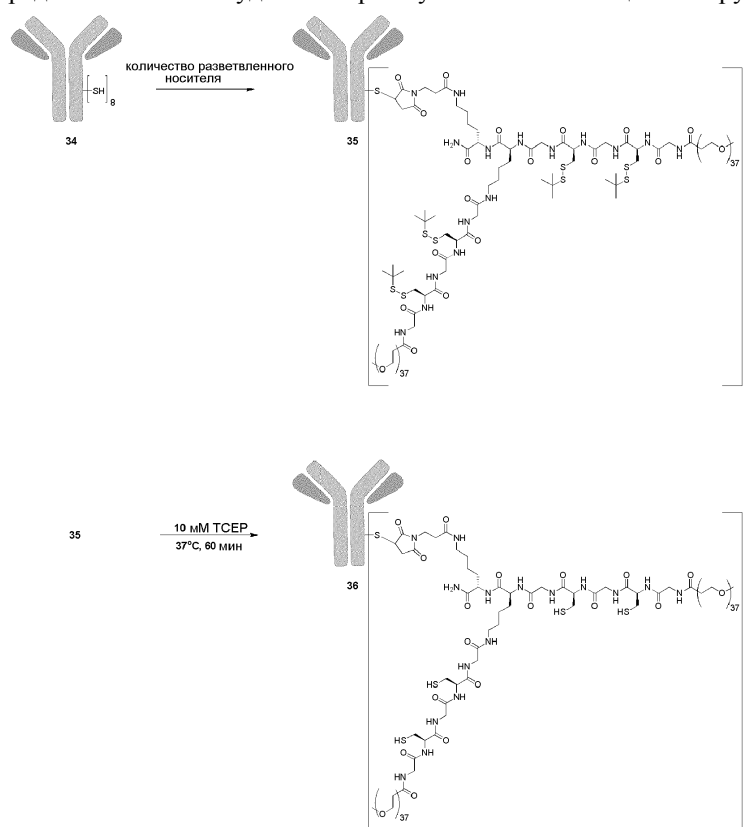
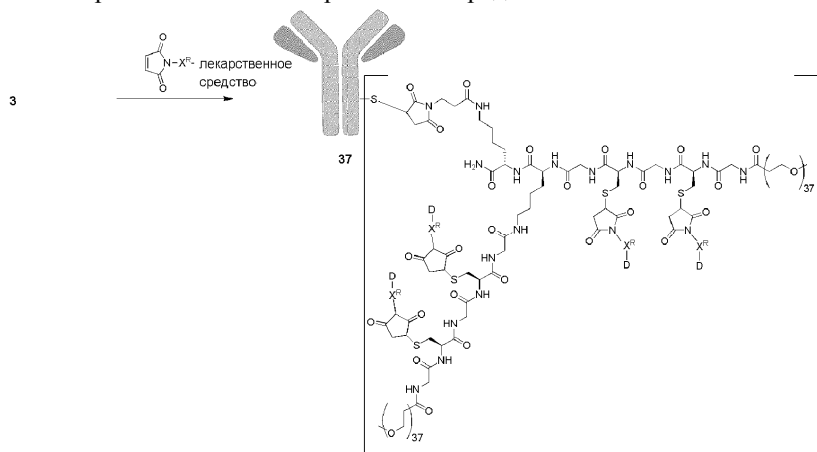


Схема 16. Конъюгация малеимид-содержащих групп лекарственное средство-линкер с разветвленным лекарственным средством-носителем



Пример 24. Получение и биологическая активность ADC, содержащих мультиплексные пегилированные каркасы

ADCs с нагрузкой 32 ауристатином и камптотецином получали из пегилированного мультиплексного каркаса С, где $n=37$, с использованием процедур примера 23. Количество агрегации было ниже уровня количественного определения, но эксклюзионная хроматография показала, что ADCs с 32-нагрузкой MMAE могут существовать в димерной форме.

sAC10 конъюгат с нагрузкой 32, содержащий -X-D группу, состоящую из *ms*-VC-PABA-MMAE, показал >5X улучшение цитотоксичности в отношении L540cy (CD30 копияность 433K) по сравнению с ADC с нагрузкой 8, даже при том, что было только 4X увеличение нагрузки лекарственным средством. Еще более существенно то, что имеющий 32 нагрузку конъюгат обладал активностью против L-428, представляющей собой другую клеточную линию лимфомы Ходжкина, не смотря на то, что эта клеточная линия имела значительно более низкое число копий антигена-мишени (CD30 копияность 77K), тогда как имеющий нагрузку 8 конъюгат считался неактивным ($IC_{50} >1$ мкМ). Также имеющий нагрузку 32 MMAE конъюгат обладал цитотоксической активностью против CD30⁺ мультирезистентной ALCL клеточной линии. В отличие от этого, имеющий нагрузку 8 MMAE конъюгат считался неактивным против

обеих клеточных линий с мультилекарственной резистентностью, хотя он обладал активностью, которая аналогична активности имеющего нагрузку 32 конъюгата против родительской клеточной линии.

sAC10 конъюгат с нагрузкой 32, который содержит -X-D группу, состоящую из MDpr-PAВ(gluc)Камптотецина, показал 3-4X улучшение цитотоксичности против L540cy по сравнению с конъюгатом с нагрузкой 8, но, подобно имеющему нагрузку 8 конъюгату, считался неактивным против L-428. Конъюгат с нагрузкой 32 имел >5X цитотоксичность против ALCL клеточных линий с мультилекарственной резистентностью по сравнению с конъюгатами с нагрузкой 8.

hBU12 конъюгат с нагрузкой 32, также содержащий -X-D группу, включающую MDpr-PAВ(gluc)-Камптотецин, также показал >5X улучшение цитотоксичности по сравнению с имеющим нагрузку 8 конъюгатом против Raj и Ramos и был активным против RL, имеющей самое низкое число копий C19. В отличие от этого, конъюгат с нагрузкой 8 был неактивным.

Таблица 7. Данные масс-спектрометрии для ADC, содержащих мультиплексные пегилированные каркасы

ADC	Рассчитанная масса (легкая цепь, тяжелая цепь)	Найденная масса (легкая цепь, тяжелая цепь)
Нагрузка=16 MDpr-глюкуронид-Камптотецин соКТ9 ADC ⁽¹⁾	29,092, ND	29,094, ND
Нагрузка=32 MDpr-глюкуронид-Камптотецин сAC10 ADC ⁽²⁾	32,501, ND	32,505, ND
Нагрузка=16 MDpr-VC-ММАЕ сAC10 ADC ⁽¹⁾	29,104, 66,460	29,108, 66,465
Нагрузка=16 mc-VC -ММАЕ сAC10 ADC ⁽³⁾	28,476, 64,575	28,481, 64,582
Нагрузка=32 mc-VC -ММАЕ сAC10 ADC ⁽²⁾	33,514, 79,690	33,514, 79,691
Нагрузка=32 MDpr-глюкуронид-ММАЕ сAC10 ADC ⁽²⁾	33,505, 79,664	33,504, 79,665

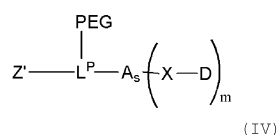
1: Полученные с мПЭГ₂₄-Cys(StBu)-Lys (MDpr)-Cys (StBu)-ПЭГ₂₄-ОН

2: Полученные с ПЭГ₃₇ разветвленный каркасом лекарственное средство-носитель

3: Полученные с MDpr-Cys(StBu)-Ala-Cys(StBu)-ПЭГ₃₆-ОН

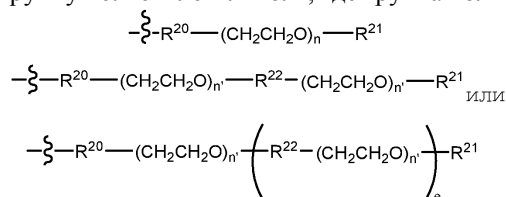
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение лекарственное средство-линкер, где соединение лекарственное средство-линкер представлено структурой формулы IV



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где D представляет собой гидрофобную группу лекарственного средства, соответствующую по структуре гидрофобному цитотоксическому, цитостатическому или иммуносупрессивному лекарственному средству, имеющую гидрофобность, измеренную как SlogP, более чем или в пределах 20% от SlogP значения у монометил ауристагина E или имеющую SlogP значение (a) от 1,5 до 7 или от 2,5 до 7, (b) от 1,5 до 6, от 2 до 6 или от 2,5 до 6, (c) от 1,5 до 5, от 2 до 5 или от 2,5 до 5, (d) от 1,5 до 4, от 2 до 4 или 2,5 до 4, или (e) от 1,5 до 3, от 2 до 3 или 2,5 до 3;

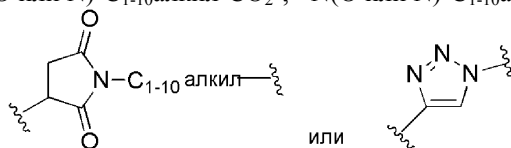
PEG представляет собой группу полиэтиленгликоля, где группа полиэтиленгликоля имеет формулу



где волнистая линия указывает участок ковалентного присоединения к L^P,

R²⁰ представляет собой группу PEG присоединения, где группа PEG присоединения представляет собой -C(O)-, -O-, -S-, -S(O)-, -NH-, -C(O)O-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-O-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-CO₂-,

-C(O)C₁₋₁₀алкил-NH-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-S-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-C(O)-NH-, -C(O)C₁₋₁₀алкил-NH-C(O)-, -C₁₋₁₀алкил-, -C₁₋₁₀алкил-O-, -C₁₋₁₀алкил-CO₂-, -C₁₋₁₀алкил-NH-, -C₁₋₁₀алкил-S-, -C₁₋₁₀алкил-C(O)-NH-, -C₁₋₁₀алкил-NH-C(O)-, -CH₂CH₂SO₂-C₁₋₁₀алкил-, -CH₂C(O)-C₁₋₁₀алкил-, =N-(O или N)-C₁₋₁₀алкил-O-, =N-(O или N)-C₁₋₁₀алкил-NH-, =N-(O или N)-C₁₋₁₀алкил-CO₂-, =N(O или N)-C₁₋₁₀алкил-S-,

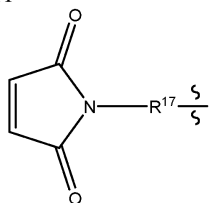


R²¹ представляет собой PEG-блокирующую группу, где PEG-блокирующая группа представляет собой -C₁-C₁₀ алкил, -C₂-C₁₀ алкил-CO₂H, -C₂-C₁₀ алкил-OH, -C₂-C₁₀ алкил-NH₂, C₂-C₁₀ алкил-NH(C₁-C₃ алкил), или C₂-C₁₀ алкил-N(C₁-C₃ алкил)₂,

R²² представляет собой PEG-связывающую группу для связывания нескольких цепей субъединиц PEG вместе, где PEG-связывающая группа представляет собой -C₁₋₁₀ алкил-C(O)-NH-, -C₁₋₁₀ алкил-NH-C(O)-, -C₂₋₁₀ алкил-NH-, -C₂₋₁₀ алкил-O-, -C₁₋₁₀ алкил-S- или -C₂₋₁₀ алкил-NH-,

нижний индекс n независимо представляет собой от 6 до 72, от 8 до 72, от 10 до 72, от 12 до 72 или от 6 до 24; нижний индекс e представляет собой от 2 до 5 и каждый n' представляет собой от по меньшей мере 8 или по меньшей мере 10 до не более чем 36, при условии что группа PEG содержит в целом не более чем 72 субъединицы -CH₂CH₂O-;

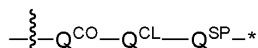
Z' представляет собой расширяющую группу, способную образовывать ковалентное присоединение к интактному антителу или антигенсвязывающему фрагменту антитела, чтобы обеспечить конъюгат антитело-лекарственное средство путем реакции с реакционноспособной тиольной функциональной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела, где Z' имеет формулу



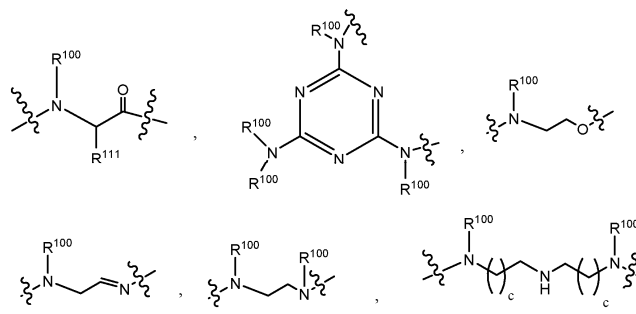
где волнистая линия около R¹⁷ указывает участок ковалентного присоединения к L^P и R¹⁷ представляет собой -C₁-C₁₀ алкилен-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-C(=O)-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-C(=O)-, -C₃-C₈ карбоцикло-C(=O)-, -O-(C₁-C₈ алкил)-C(=O)-, -C₁-C₁₀ алкилен-NH-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-NH-, -O-(C₁-C₈ алкил)-NH-, C₁-C₁₀ алкилен-S-, C₁-C₁₀ гетероалкилен-S-, или -O-(C₁-C₈ алкил)-S-,

где R¹⁷ необязательно замещен -(CH₂)_xNH₂, -(CH₂)_xNHR^a и -(CH₂)_xNR^a₂, где нижний индекс x представляет собой целое число, имеющее значение 1-4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила, или две R^a группы объединены с атомом азота, с которым они связаны, с образованием азетидинильной, пирролидинильной или пиперидинильной группы;

X представляет собой высвобождаемую комплексную группу, где высвобождаемая комплексная группа имеет формулу



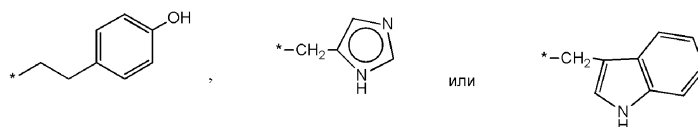
где Q^{CO} представляет собой группу ковалентного присоединения, Q^{SP} представляет собой необязательную спейсерную группу, Q^{CL} представляет собой расщепляемую группу, звездочка указывает участок ковалентного присоединения к группе лекарственного средства, волнистая линия указывает ковалентное присоединение к L^P или A, в зависимости от присутствия или отсутствия A соответственно, группа ковалентного присоединения (Q^{CO}), если присутствует, имеет формулу



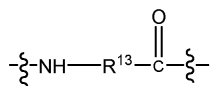
каждый R¹⁰⁰ независимо выбран из группы, состоящей из -H или -C₁-C₃ алкила, или выбран из группы, состоящей из -H или CH₃,

R¹¹¹ представляет собой п-гидроксibenзил, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, -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-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-



каждый нижний индекс с независимо представляет собой целое число от 1 до 10 или от 1 до 3 или Q^{CO} имеет формулу:

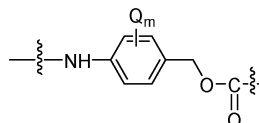


R¹³ независимо выбран из -C₁-C₆ алкилен-, -C₃-C₈карбоцикло-, -арилен-, -C₁-C₁₀ гетероалкилен-, -C₃-C₈гетероцикло-, -C₁-C₁₀алкилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈карбоцикло)-, -(C₃-C₈карбоцикло)-C₁-C₁₀алкилен-, -C₁-C₁₀алкилен-(C₃-C₈гетероцикло)- или -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-,

расщепляемая группа представляет собой пептидную расщепляемую группу, представляющую дипептид, с расщепляемой связью с Q^{SP} или D, в зависимости от присутствия или отсутствия, соответственно, Q^{SP}, где указанная расщепляемая связь является расщепляемой опухоль-ассоциированной протеазой, или пептидная расщепляемая группа представляет собой дипептид -val-cit-, -phe-lys- или -val-ala-, имеющий расщепляемую связь с Q^{SP} или D, и

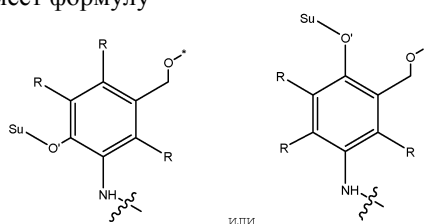
спейсерная группа (Q^{SP}), если присутствует, включает группу п-аминобензилового спирта (РАВ), которая связана с дипептидом пептидной расщепляемой через атом азота amino РАВ группы и соединена непосредственно с гидрофобной группой лекарственного средства через карбонатную, карбаматную или эфирную функциональную группу, где РАВ группа и смежная карбонильная группа карбонатной или карбаматной группы являются частью спейсерной группы; или

Q^{SP} имеет формулу



где Q представляет собой -C₁-C₈алкил, -O-(C₁-C₈алкил), -галоген, -нитро или -циано, нижний индекс m представляет собой целое число, выбранное из 0-4, и волнистая линия около атома азота указывает участок ковалентного присоединения к дипептиду пептидной расщепляемой группы, и волнистая линия около атома углерода карбонила указывает участок ковалентного присоединения к атому кислорода или азота гидрофобной группы лекарственного средства;

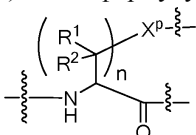
где расщепляемая группа имеет формулу



Su представляет собой сахарный компонент, -O'-представляет собой кислородную гликозидную связь, которая расщепляется гликозидазой, или сахарный компонент представляет собой остаток глюконовой кислоты, и гликозидаза представляет собой бета-глюкуронидазу,

каждый R независимо представляет собой водород, галоген, -CN или -NO₂, волнистая линия указывает участок ковалентного присоединения к L^P или A, в зависимости от присутствия или отсутствия A, соответственно, непосредственно или опосредованно через группу ковалентного присоединения, и звездочка указывает участок ковалентного присоединения гидрофобной группы лекарственного средства, непосредственно или опосредованно через спейсерную группу, где спейсерная группа, если присутствует, представляет собой -C(=O)-;

параллельное соединительное звено (L^P) имеет формулу



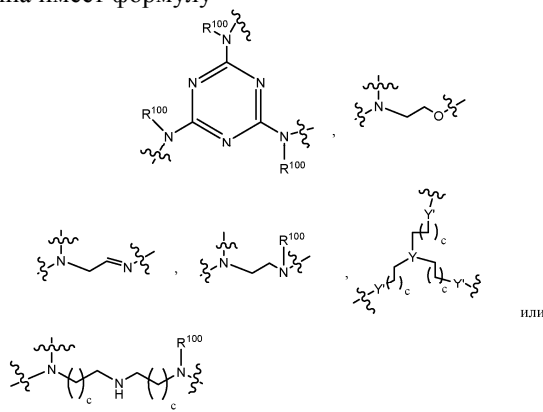
где нижний индекс n представляет собой целое число от 1 до 4, X^P выбирают из группы, состоящей из -O-, -NH-, -S- и -C(=O)-,

R^1 и R^2 независимо выбирают из группы, состоящей из -H, $-C_1-C_3$ алкила, и волнистая линия указывает участки ковалентного присоединения в соединении лекарственное средство-линкер;

A представляет собой необязательную разветвляющуюся группу, где разветвляющаяся группа представляет собой единую группу, является по меньшей мере трифункциональной или содержит 2, 3, 4 или 5 субъединиц для обеспечения необходимого количества участков ковалентного присоединения для L^P и X-D групп,

где разветвляющаяся группа или ее субъединица независимо выбраны из остатков аминокислоты, аминокспирта, альдегида или их комбинации, где по меньшей мере один из таких остатков имеет функционализированную боковую цепь для обеспечения участка ковалентного присоединения к L^P и участка ковалентного присоединения к X-D группе, или

где разветвляющаяся группа имеет формулу

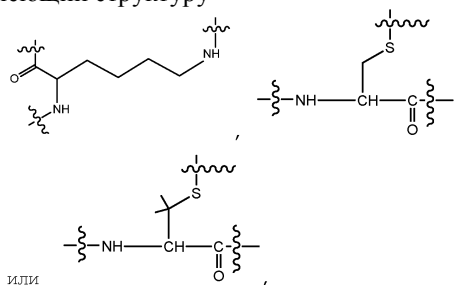


где R^{100} представляет собой такую, как определено ранее для L^P , каждый Y' независимо выбран из группы, состоящей NH, O и S, каждый нижний индекс с независимо представляет собой целое число от 1 до 10 или от 1 до 3, где волнистая линия указывает два или три из трех участков ковалентного присоединения в соединении лиганд-лекарственное средство;

нижний индекс m представляет собой целое число от 1 до 4 или m представляет собой 1 или 2 и

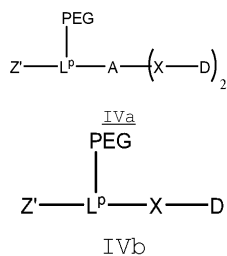
нижний индекс s имеет значение 0 или 1, при условии, что когда нижний индекс s имеет значение 0, нижний индекс m имеет значение 1, и когда нижний индекс s имеет значение 1, нижний индекс m имеет значение 2, 3 или 4.

2. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где L^P представляет собой трифункциональный аминокислотный остаток, имеющий структуру



где волнистые линии указывают участки ковалентного присоединения в соединении лекарственное средство-линкер.

3. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру IVa или IVb

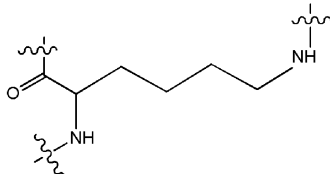


или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

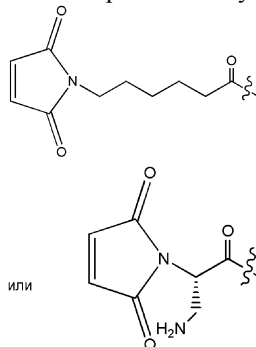
4. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где нижний индекс s представляет собой 0, таким образом A отсутствует.

5. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где нижний индекс s имеет значение 1 и нижний m имеет значение 2, 3 или 4.

6. Соединение лекарственное средство-линкер по любому из пп.1-5, где каждый L^P имеет структуру

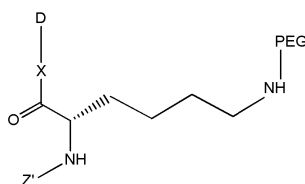


7. Соединение лекарственное средство-линкер по любому из пп.1-6, где Z' имеет структуру



необязательно защищенную аминзащитной группой, где волнистая линия указывает ковалентное присоединение к остальной части структуры соединения лекарственное средство-линкер.

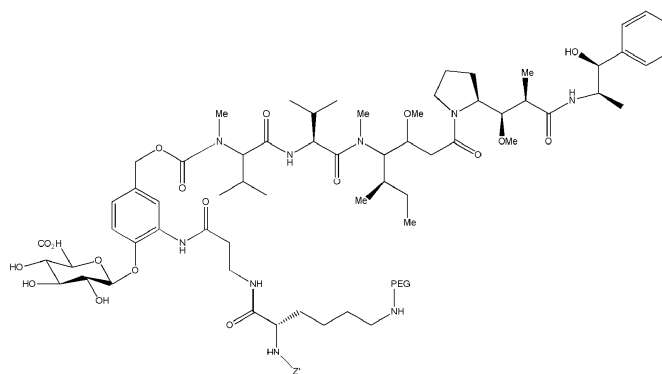
8. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру



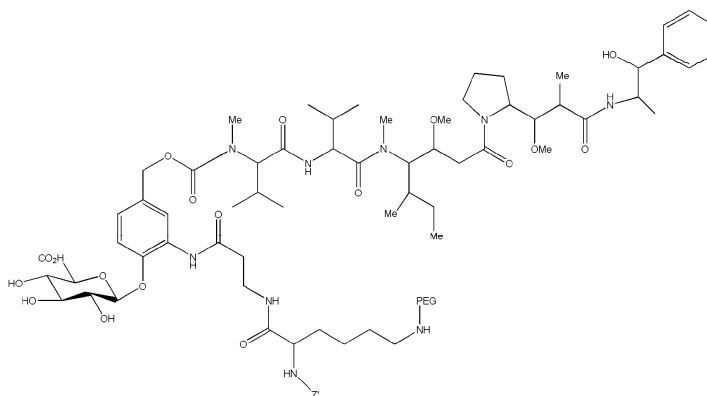
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

9. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру

046498

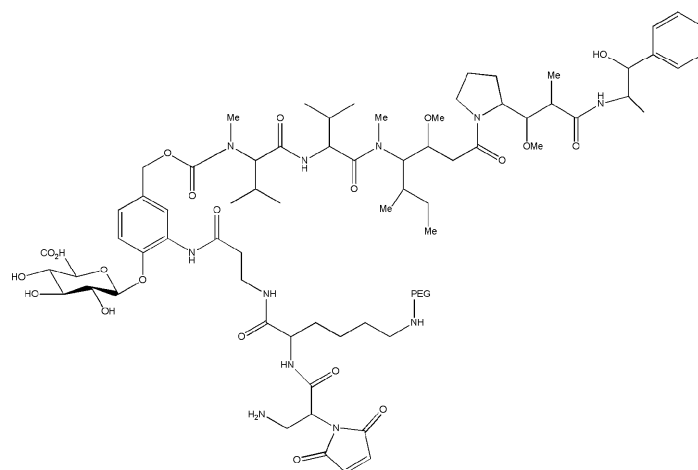
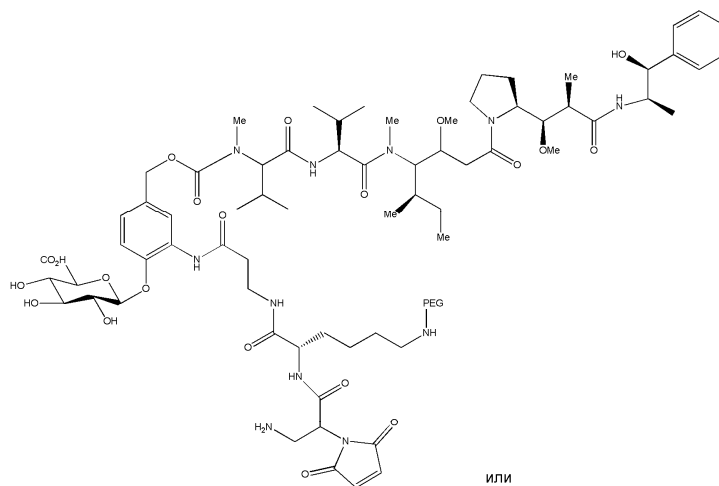


ИЛИ



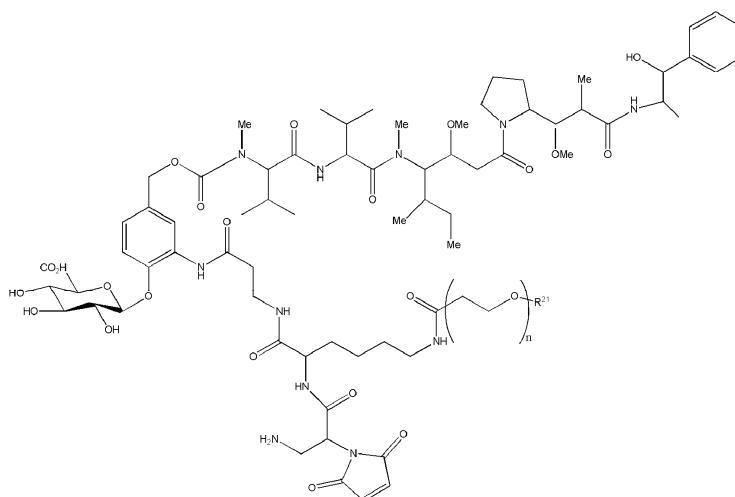
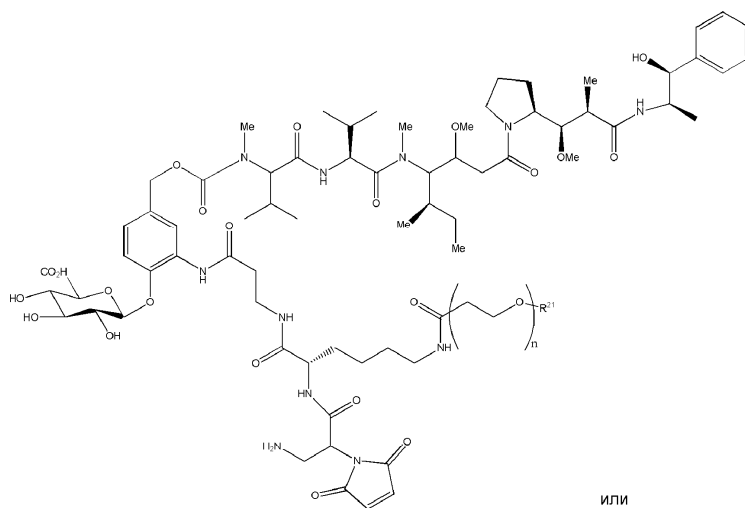
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

10. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру



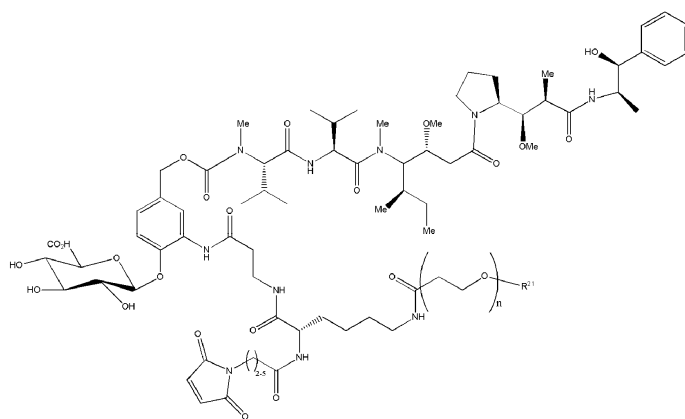
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

11. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру

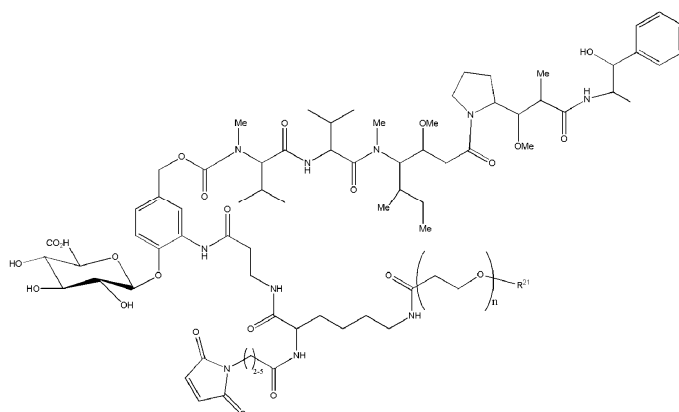


или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где R^{21} представляет собой PEG-блокирующую группу и нижний индекс n представляет собой целое число, выбранное из от 6 до 72, от 8 до 72, или от 8 до 24.

12. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение лекарственное средство-линкер имеет структуру



ИЛИ

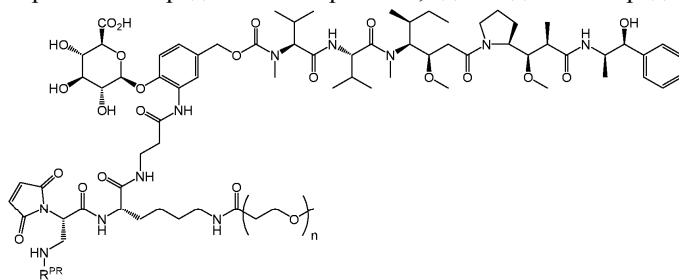


или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где R^{21} представляет собой PEG-блокирующую группу и нижний индекс n представляет собой целое число, выбранное из от 6 до 72 или от 8 до 72 или от 8 до 24.

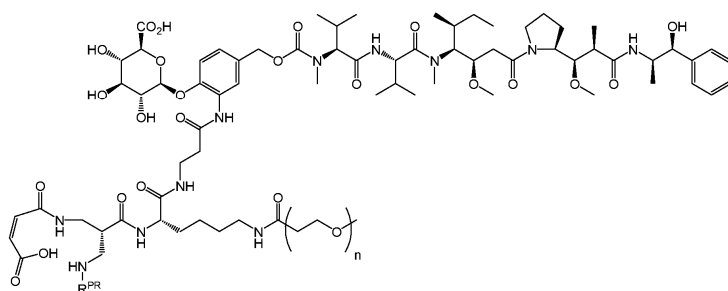
13. Соединение лекарственное средство-линкер по п.11 или 12, где нижний индекс n имеет значение 8, 12 или 24.

14. Соединение лекарственное средство-линкер по любому из пп.11-13, где R^{21} представляет собой метил, этил или пропил.

15. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение представлено структурой

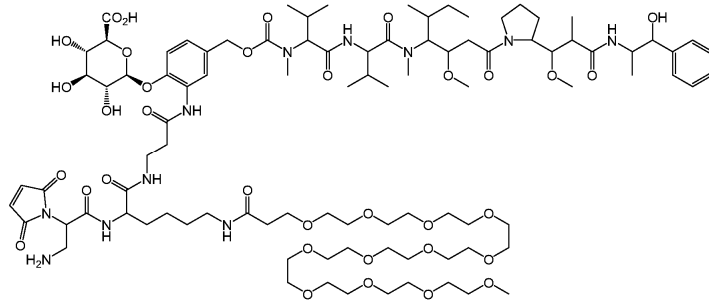


ИЛИ



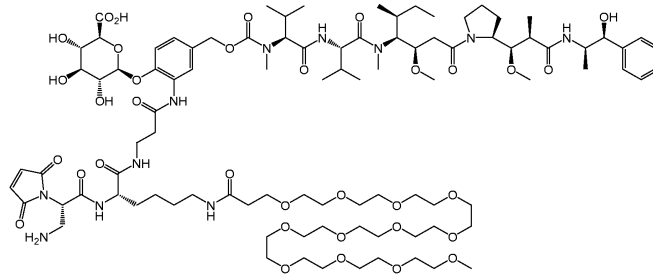
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где R^{PR} представляет собой водород или защитную группу и n представляет собой 8, 10, 12 или 24.

16. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение представлено структурой



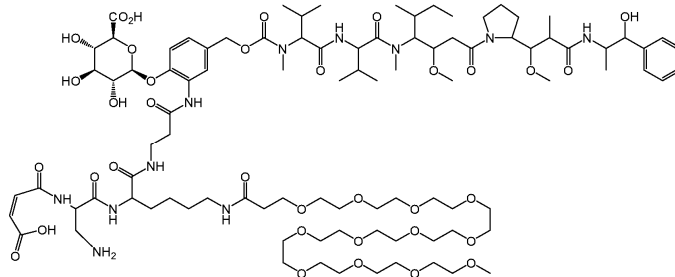
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

17. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение представлено структурой



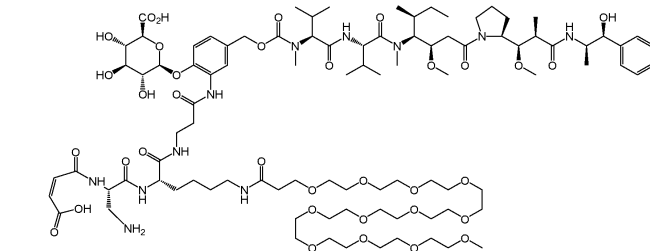
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

18. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение представлено структурой



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

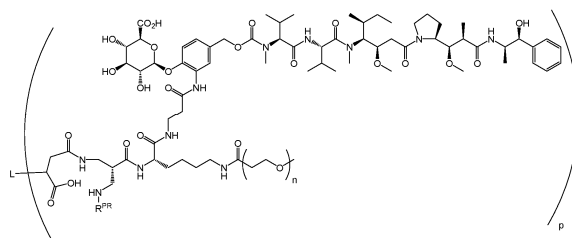
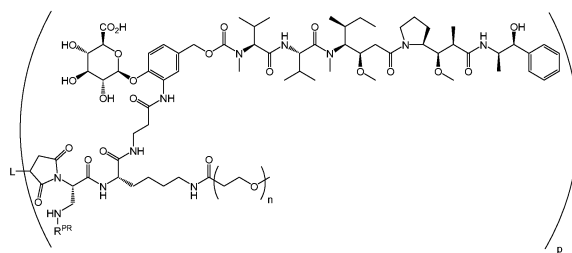
19. Соединение лекарственное средство-линкер по п.1, где соединение представлено структурой



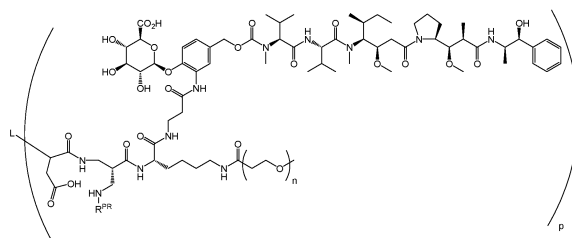
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения.

20. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство, имеющее лекарственное средство-линкер компонент, соответствующий по структуре соединению лекарственное средство-линкер по любому из пп.1-13, ковалентно присоединенный к группе лиганда реакцией реакционноспособной тиольной функциональной группы антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела с Z' соединения лекарственное соединение-линкер, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела специфически связываются с раковая клетка- или опухолевая клетка-ассоциированным антигеном, где указанное связывание представляет группу лекарственного средства конъюгата лекарственное средство-линкер к конкретной популяции раковых клеток или опухолевых клеток, с которой группа лиганда взаимодействует.

21. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.20, где соединение представлено структурой



, ИЛИ



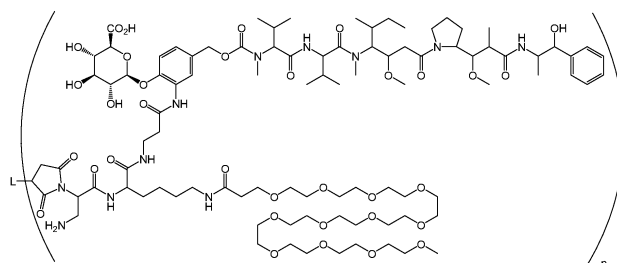
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где

R^{PR} представляет собой водород или защитную группу;

p представляет собой целое число в пределах от 1 до 14 и

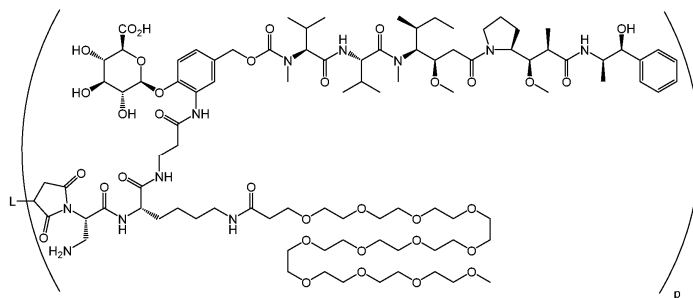
n представляет собой 8, 10, 12 или 24.

22. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.20, где соединение представлено структурой



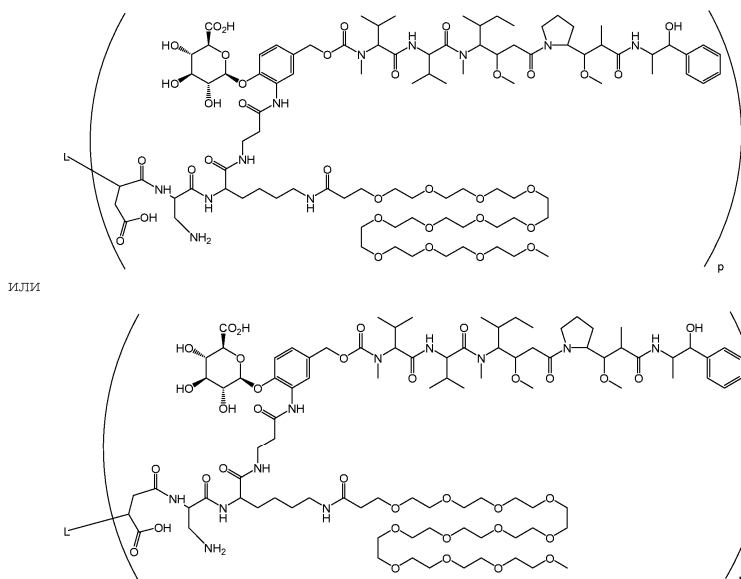
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, и p представляет собой целое число в пределах от 1 до 14.

23. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.20, где соединение представлено структурой



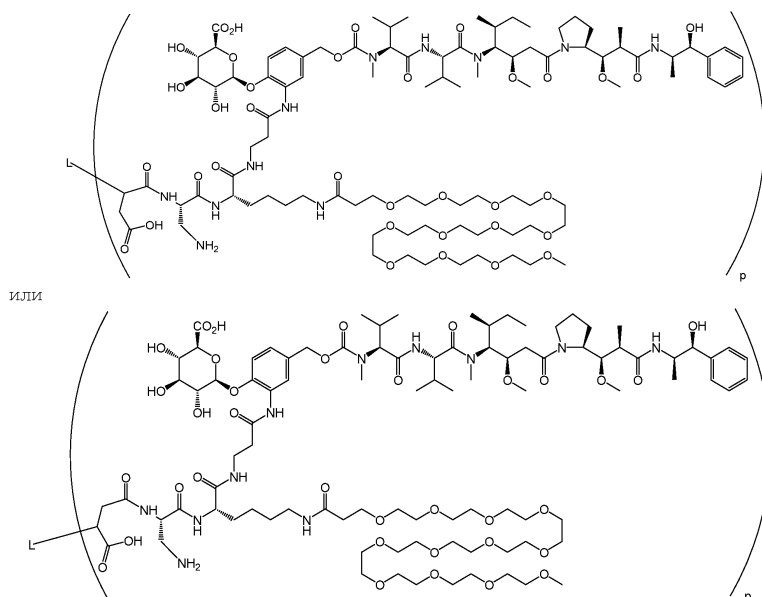
или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где p представляет собой целое число в пределах от 1 до 14.

24. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.20, где соединение представлено структурой



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где p представляет собой целое число в пределах от 1 до 14.

25. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.20, где соединение представлено структурой



или фармацевтически приемлемая соль такого соединения, где p представляет собой целое число в пределах от 1 до 14.

26. Фармацевтическая композиция, включающая популяцию соединений конъюгатов лиганд-лекарственное средство, каждое из которых имеет один или более компонентов лекарственное средство-линкер, соответствующие по структуре соединению лекарственное средство-линкер по любому из пп.1-19, ковалентно присоединенные к группе лиганда, где группа лиганда получена реакцией реакционно-способной тиольной функциональной группы антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела с Z' соединения лекарственное соединение-линкер, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела специфически связываются с раковая клетка- или опухолевая клетка-ассоциированным антигеном; и фармацевтически приемлемый носитель, где среднее количество компонентов лекарственное средство-линкер на группу лиганда в популяции составляет от 1 до 14.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, где каждая группа PEG компонентов лекарственное средство-линкер соединений конъюгата лиганд-лекарственное средство содержит от по меньшей мере 8 до не более чем 24 $-CH_2CH_2O-$ субъединиц.

28. Фармацевтическая композиция по п.26, где каждая группа PEG компонентов лекарственное средство-линкер соединений конъюгатов лиганд-лекарственное средство содержит от по меньшей мере 12 до не более чем 24 $-CH_2CH_2O-$ субъединиц.

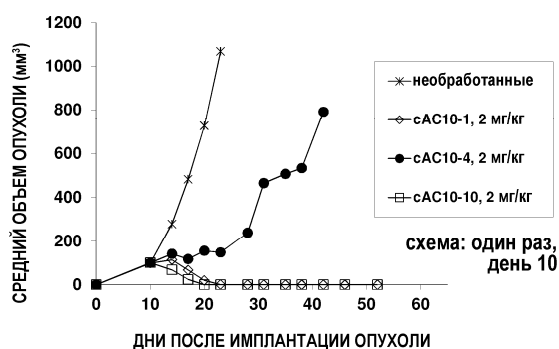
29. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-28, где среднее количество компонентов лекарственное средство-линкер на группу лиганда в популяции составляет от около 8 до 14.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-29, где популяция соединений конъюгатов лиганд-лекарственное средство содержит преобладающее соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство и где среднее количество компонентов лекарственное средство-линкер на группу лиганда является таким же, как количество компонентов лекарственное средство-линкер преобладающего соединения конъюгата лиганд-лекарственное средство в популяции.

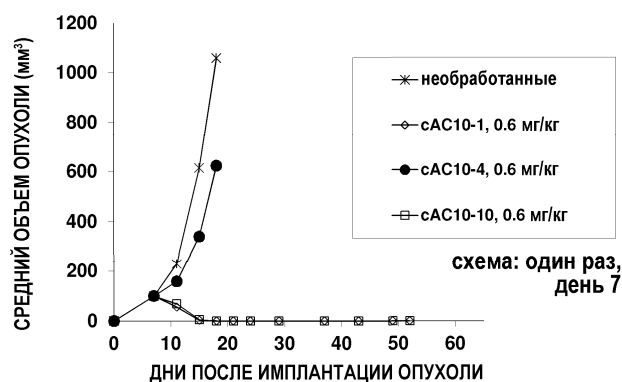
31. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство по любому из пп.20-25 или фармацевтической композиции по любому из пп.26-30.

32. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по любому из пп.20-25, где группа лиганда представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, альфа- ν -бета-6 или Liv-1 антигеном.

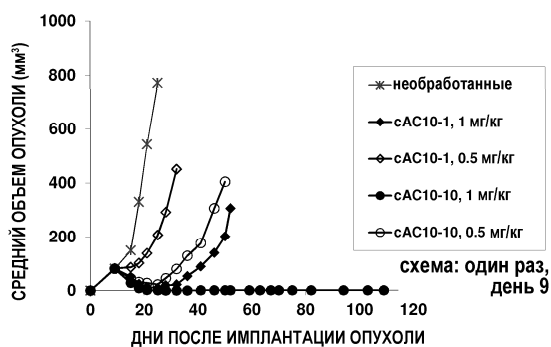
33. Соединение конъюгат лиганд-лекарственное средство по п.32, где группа лиганда представляет собой химерное или гуманизированное AC10 антитело.



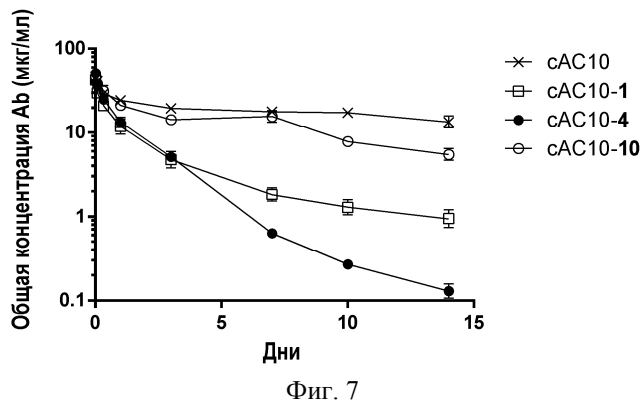
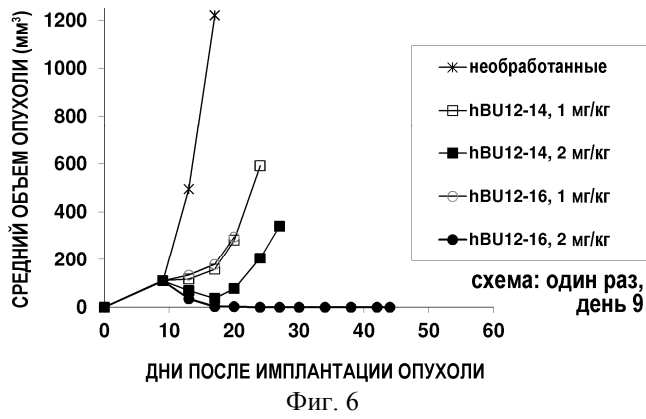
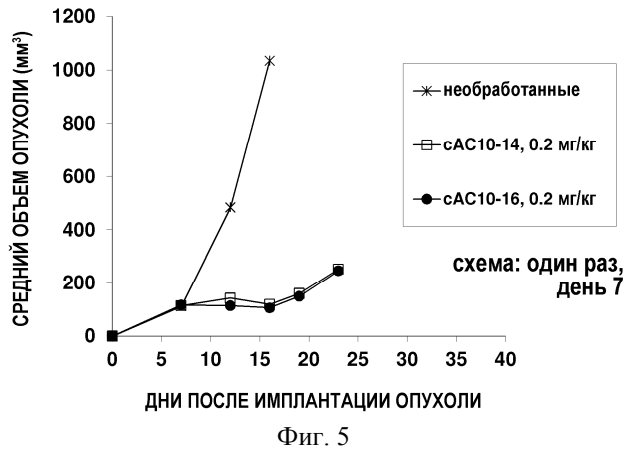
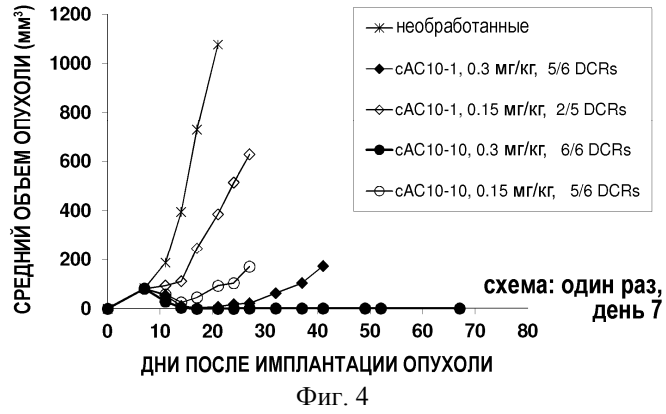
Фиг. 1

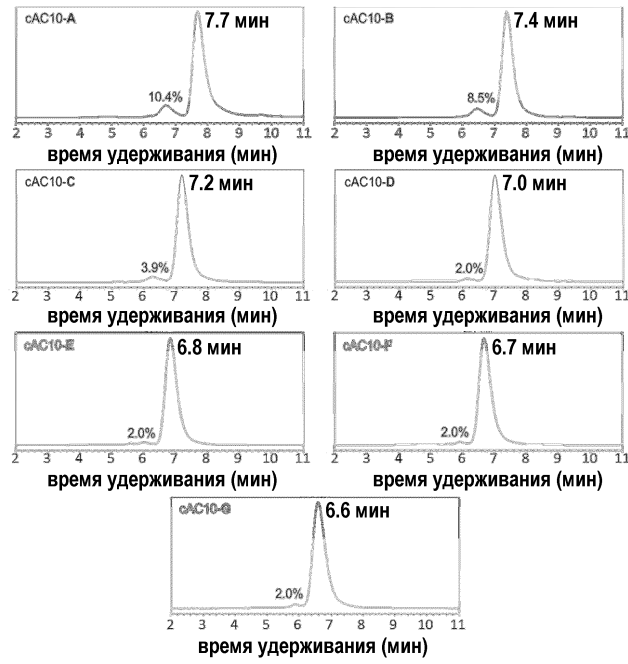


Фиг. 2

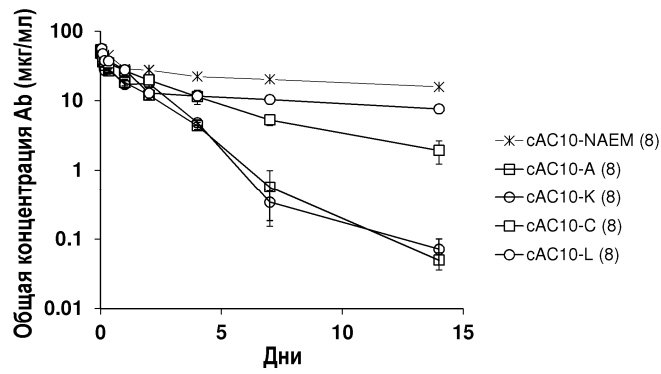


Фиг. 3

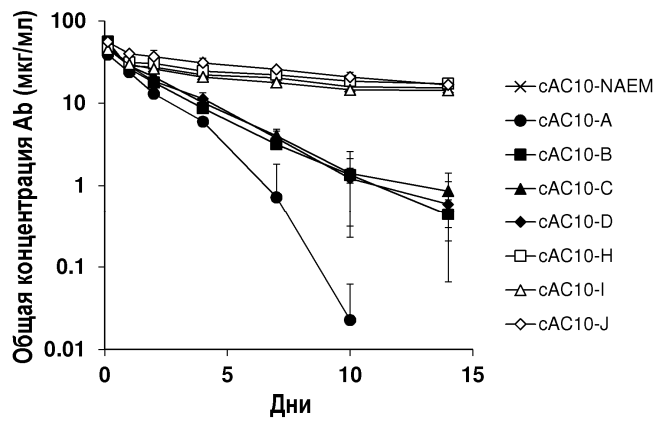




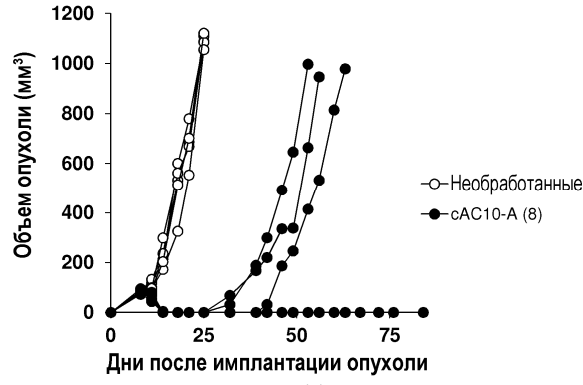
Фиг. 8



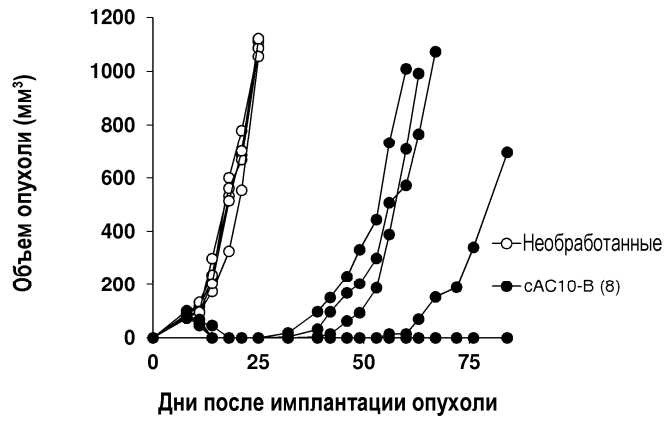
Фиг. 9



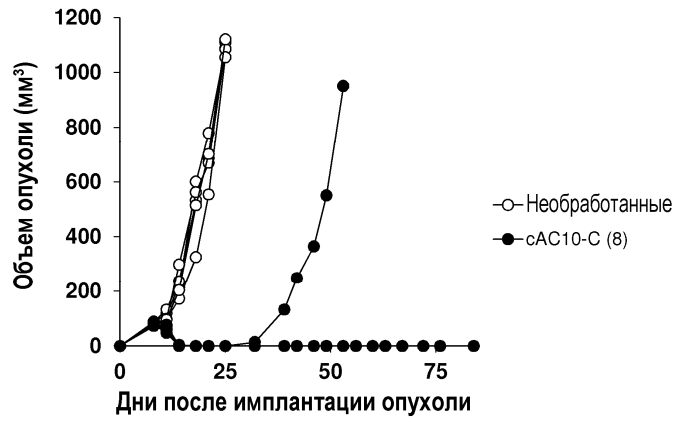
Фиг. 10



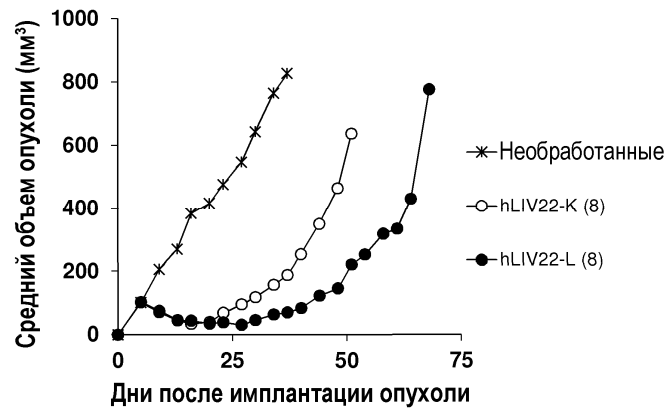
Фиг. 11



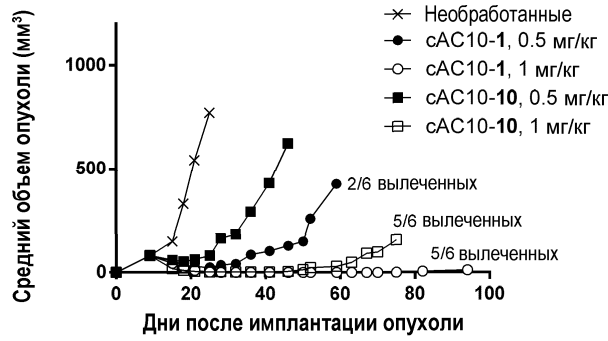
Фиг. 12



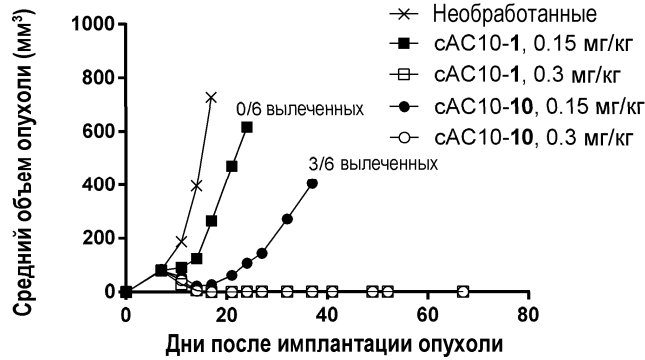
Фиг. 13



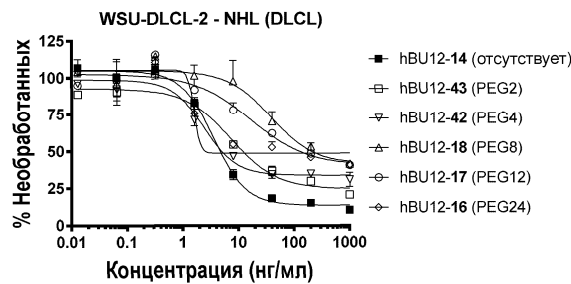
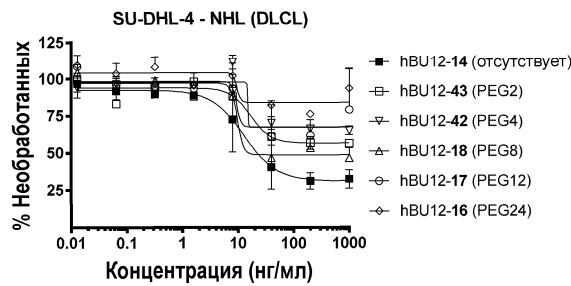
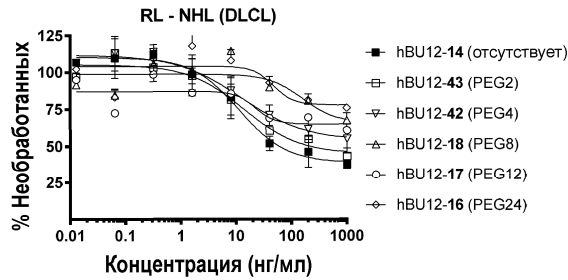
Фиг. 14



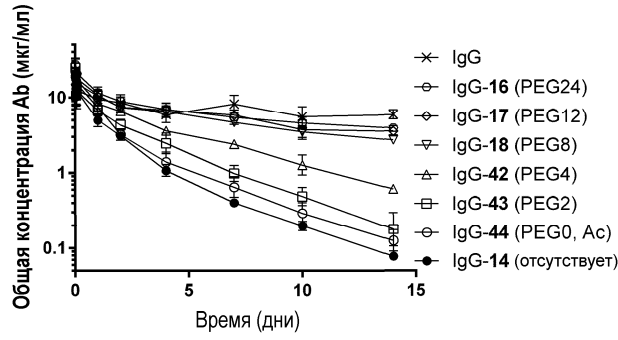
Фиг. 15



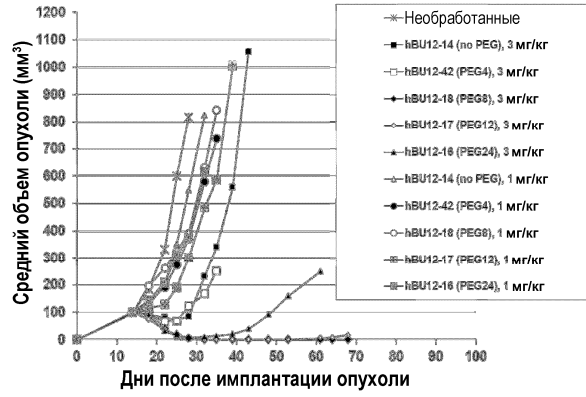
Фиг. 16



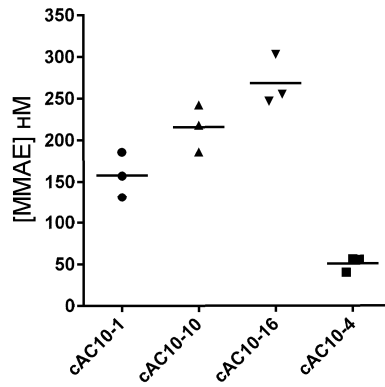
Фиг. 17



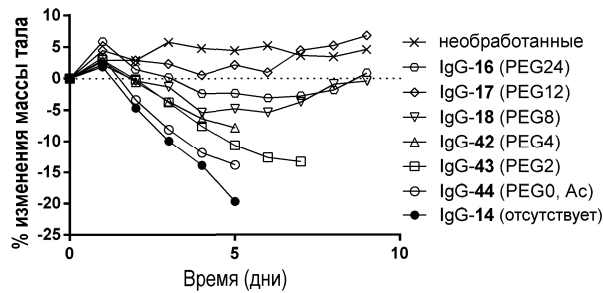
Фиг. 18



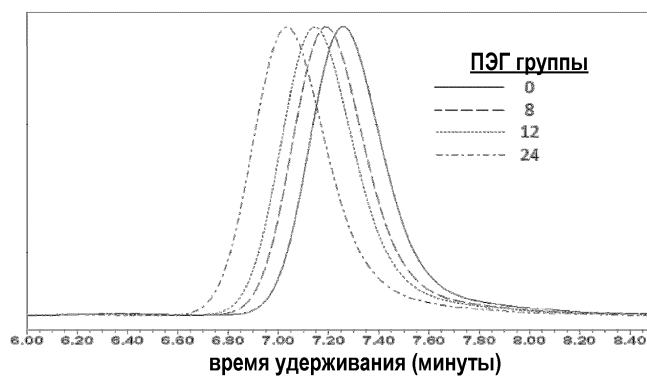
Фиг. 19



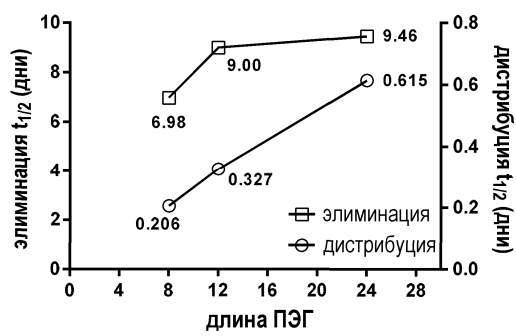
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

