

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992456 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.28

(51) Int. Cl. C07D 207/40 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.05.14

(54) САМОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕСЯ ЛИНКЕРНЫЕ КОНЬЮГАТЫ

(31) 61/647,373; 61/770,983; 61/773,067;
13/799,244

(72) Изобретатель:
Лайон Роберт, Доронина Светлана,
Боуви Тимоти (US)

(32) 2012.05.15; 2013.02.28; 2013.03.05;
2013.03.13

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(33) US

(62) 201401254; 2013.05.14

(71) Заявитель:
СИЭТЛ ДЖИНЕТИКС, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение раскрывает конъюгаты лиганд-лекарство, лекарство-линкеры, линкеры и конъюгаты лиганд-линкер, содержащие компонент самостабилизирующей линкерной области.

201992456

A2

A2

201992456

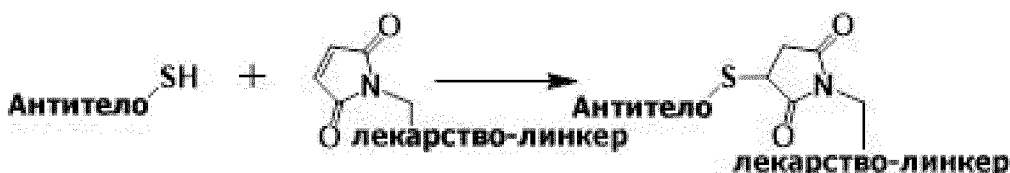
САМОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕСЯ ЛИНКЕРНЫЕ КОНЬЮГАТЫ

Преимственность

Для настоящего изобретения испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/647,373, поданной 15 мая 2012 г. и предварительной заявке на патент США № 61/773,067, поданной 5 марта 2013 г., а также приоритет по заявке на патент США № 13/799,244, поданной 13 марта 2013 г., каждая из которых включена в настоящий документ полностью для всех возможных целей.

Уровень техники

В области конъюгатов антитело - лекарство (ADC) были достигнуты значительные успехи, когда Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) одобрило использование препарата Брентуксимаб ведотин для лечения отдельных групп пациентов, а также когда многие другие ADC распространились в клинической практике. Линкерный компонент ADC – одна из важных особенностей в разработке оптимизированных терапевтических средств, высокоактивных в хорошо переносимых дозах. Доказано, что электрофильная малеимидная функциональная группа очень удобна для изготовления ADC благодаря ее высокой специфичности при реакциях с тиольными группами и очень быстрой кинетике присоединения тиола в щадящих условиях.



Как отмечалось многими исследователями в области биоконъюгатов, тиозамещенный продукт реакции между электрофильной малеимидной функциональной группой и свободным тиолом антитела подвергается медленному расщеплению, тем самым делая обратимой вышеописанную реакцию:



Когда эта обратимая реакция происходит в очищенном препарате ADC, она, в основном, недоступна для обнаружения, потому что малеимид и тиол, которые регенерируются в процессе расщепления, просто реагируют снова, тем самым

восстанавливая исходный конъюгат. Однако, когда присутствуют другие тиолы, совокупным эффектом может быть перенос малеимида от антитела из ADC на любой другой доступный тиол. Задokumentировано, что этот процесс происходит в плазме, в которой малеимид от ADC переносится к цистеину 34 альбумина сыворотки (Alley et al., *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 759-765). Об этом процессе также сообщалось, если ADC инкубировали в присутствии избытка цистеина или глутатиона (Shen et al., *Nature Biotech.* 30(2): 184-9, 2012). Настоящее изобретение предлагает, *среди прочего*, биоконъюгаты, которые не участвуют в таких реакциях переноса.

Сущность изобретения

Изобретение, *в частности*, раскрывает Линкеры, Лекарство-Линкеры, Конъюгаты Лиганд-Лекарство, Конъюгаты Лиганд-Функциональное Средство, и Функциональное Средство-Линкеры, и способы их получения и использования. Конъюгаты Лиганд-Лекарство стабильны в кровотоке, и при этом способны вызывать гибель клетки, когда они высвобождаются вблизи или внутри опухолевых клеток.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет схему реакции, иллюстрирующую восстановление межцепочечных дисульфидов человеческого IgG1, с последующей конъюгацией полученных в результате тиолов с самостабилизирующимся линкером и последующим гидролизом сукцинимидного кольца (вверху); а также использование масс-спектрометрии для отслеживания изменений в молекулярной массе конъюгатов антител вследствие гидролиза (внизу).

Фигура 2 иллюстрирует динамику гидролиза сукцинимидного кольца самостабилизирующегося конъюгата антител при помощи электрораспылительной масс-спектрометрии. Конъюгацию полностью восстановленного cAC10 с малеимида-DPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ осуществляли при pH 7,2 и 22°C, затем образцы подвергали анализу ЖХ-МС в указанные моменты времени (вверху). Полученные в результате данные по % гидролиза наносили на график напротив времени и аппроксимировали экспоненциальным уравнением, чтобы определить кинетические параметры (внизу).

Фигура 3 представляет профили кинетики гидролиза для биоконъюгатов, изготовленных с антителом IgG1 и самостабилизирующимися линкерами с варьирующимся промежутком между малеимидом и основной группой (первичным амином). Конъюгацию осуществляли при pH 8 и 37°C, затем гидролиз легкоцепочечного конъюгата IgG1 немедленно отслеживали с помощью масс-спектрометрии, изображали

как функцию времени и аппроксимировали экспоненциальным уравнением.

Фигура 4 представляет профили кинетики гидролиза биоконъюгатов, изготовленных с антителом IgG1 и самостабилизирующимися малеимидными линкерами с варьирующимся промежутком между малеимидом и основной группой (первичным амином). Конъюгацию осуществляли при pH 8 и 37°C, затем гидролиз легкоцепочечного конъюгата IgG1 немедленно отслеживали с помощью масс-спектрометрии, изображали как функцию времени и аппроксимировали экспоненциальным уравнением.

Фигура 5 представляет профили кинетики гидролиза для биоконъюгатов, изготовленных с антителом IgG1 и различными N-замещенными малеимидами. Конъюгацию осуществляли при pH 7,4 и 22°C, затем гидролиз легкоцепочечного конъюгата IgG1 немедленно отслеживали с помощью масс-спектрометрии, изображали как функцию времени и аппроксимировали экспоненциальным уравнением. Гидролиз малеимидо-капроилового конъюгата (нижняя структура) протекает слишком медленно, чтобы привести к сколько-нибудь заметному гидролизу за 24 часа в этих условиях. Присутствие карбоксамидной электроноакцепторной группы (EWG) или первичного амина (BASE) ускоряет гидролиз, и сочетание обоих (верхняя структура) приводит к получению конъюгата, который гидролизуется с полупериодом менее 20 минут в этих мягких условиях.

Фигура 6 представляет профили кинетики гидролиза для самостабилизирующихся малеимидных лекарство-линкеров, изготовленных с α -диаминопропионовой кислотой (α -DPR, незакрашенные кружки) и с β -диаминопропионовой кислотой (β -DPR, закрашенные кружки). Хотя эти вещества изомерны друг другу, другое расположение основной аминогруппы электроноакцепторного карбоксамида относительно сукцинимида приводит к 17-кратной разнице в скорости гидролиза сукцинимида.

Фигура 7 иллюстрирует изменение в концентрации лекарства со временем для ADC, изготовленного с самостабилизирующимся малеимидо-DPR лекарство-линкером, по сравнению с изготовленным с малеимидо-капроильным лекарство-линкером, который инкубировали в буфере, содержащем избыток тиола. Хроматограммы с обращенной фазой двух ADC в начальный момент времени и через 14 дней после инкубации показаны на верхней панели. Обозначения хроматографических пиков L0, L1, H0, H1, H2, и H3 соответствуют неконъюгированной легкой цепи, легкой цепи с одним лекарством, неконъюгированной тяжелой цепи и тяжелой цепи с 1, 2, или 3 лекарствами, соответственно. Самостабилизирующийся малеимидо-DPR лекарство-линкер представлен открытыми кругами в сопоставлении с изготовленным с малеимидо-капроильным лекарство-линкером (незакрашенные квадраты). Содержание лекарства остается

постоянным на уровне 8 молекул на антитело для самостабилизирующегося лекарства-линкера (незакрашенные круги), но падает до 4 молекул лекарства на антитело через 14 дней для малеимидо-капроильного лекарство-линкера (незакрашенные квадраты), отражая потери лекарства в результате разрушения малеимида.

Фигура 8 иллюстрирует изменение в концентрации лекарства со временем для ADC, изготовленных с самостабилизирующимся малеимидо-DPR лекарством-линкером и малеимидо-капроильным лекарством-линкером, инкубированными в плазме крыс при 37 °C (R=Вал-Цит-РАВ-MMAE). Образцы ADC в каждый момент времени очищали на смолах, обладающих сродством к иммуноглобулинам, (Ig Select affinity resin), и содержание лекарства оценивали обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом ADC.

Фигура 9 представляет профиль стабильности лекарств, сконъюгированных с антителами через малеимидо-капроильный лекарство-линкер (квадраты) или самостабилизирующийся малеимидный линкер (круги) во время инкубации в плазме крыс (незакрашенные обозначения) или человека (закрашенные обозначения) (R=Вал-Цит-РАВ-MMAE). ADC захватывались на смолу со сродством к белку А в каждый момент времени, и лекарство высвобождалось ферментативно через свой расщепляемый протеазой линкер. Высвобожденное лекарство затем определяли количественно методом ЖХ-МС/МС и нормировали по начальному значению. В каждый момент времени отображается процент от конъюгированного лекарства, которое наблюдалось в момент t_0 .

Фигура 10 иллюстрирует снижение содержания лекарства *in vivo* (крысы) для ADC, изготовленных с самостабилизирующимся малеимидо-DPR лекарство-линкером и малеимидо-капроильным лекарством-линкером (R=Вал-Цит-РАВ-MMAE). ADC вводили внутривенно, и образцы плазмы от каждого момента времени очищали на иммуноаффинных смолах (Ig Select affinity resin), и содержание лекарства на них оценивали обращенно-фазовым ВЭЖХ анализом ADC.

Фигура 11 иллюстрирует противоопухолевую активность ADC на ксенотрансплантатной модели у мышей ALCL (клеточная линия Karpas-299). ADC были изготовлены с антителом сAC10 против CD30 и лекарство-линкерами, содержащими Вал-Цит-РАВ-MMAE, цитотоксический агент, присоединенный к антителу или через малеимидо-капроильную группу (закрашенные круги), или через самостабилизирующуюся малеимидо-DPR группу (незакрашенные круги). Опухолям позволяли достичь объема приблизительно 250 мм³ перед введением по 1 мг/кг еженедельно трех доз (шесть мышей на дозовую группу). Группа, принимавшая самостабилизирующийся ADC, показала полную ремиссию (нет заметной опухоли) у всех шести животных, у пяти животных наблюдалась продолжительная ремиссия, тогда как в

группе с малеими́до-капрои́льным ADC полной ремиссии не наблюдалось.

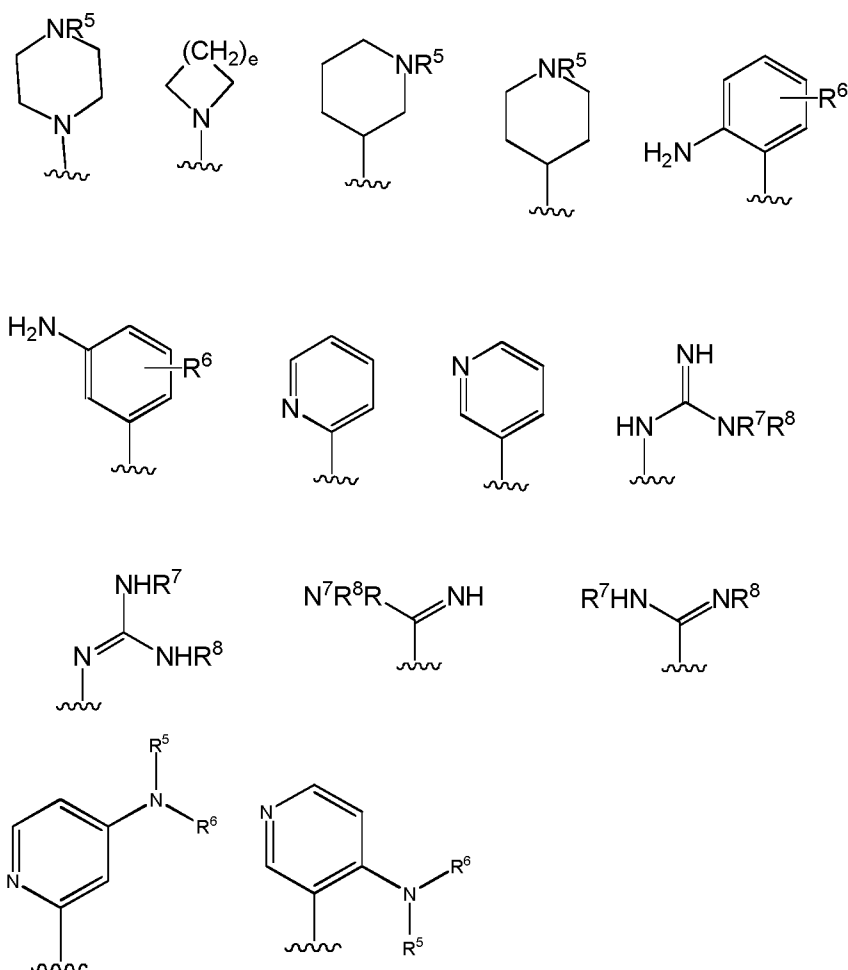
Подробное описание

Сокращения и определения

Если прямо не сказано иное, следующие термины и фразы в данном изобретении имеют следующие значения. Если в данном изобретении используются торговые наименования, они включают в себя рецептуру продукта, дженерики, и активный фармацевтический ингредиент(ы) торгового наименования продукта, если из контекста не следует иное.

Термин “электроноакцепторная группа” относится к функциональной группе, которая удаляет электроны из реакционного центра. Типичные электроноакцепторные группы включают в себя, но не ограничиваются этим, $-C(=O)$, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$, $-X$, $-COOR$, $-CONR_2$, $-COR$, $-COX$, $-SO_2R$, $-SO_2OR$, $-SO_2NHR$, $-SO_2NR_2$, $-PO_3R_2$, $-P(O)(CH_3)NHR$, NO , $-NR_3^+$, $-CR=CR_2$, и $-C\equiv CR$, где X является F , Br , Cl , или I , и R в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C_{1-6} алкила. Типичные электроноакцепторные группы могут также включать в себя арильные группы (например, фенил) и некоторые гетероарильные группы (например, пиридин). Термин “электроноакцепторные группы” включает в себя арилы или гетероарилы, дополнительно замещенные электроноакцепторными группами. Предпочтительными электроноакцепторными группами являются $-C(=O)$, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$ и $-X$.

Термин “основание” относится к функциональной группе, которая депротонирует воду, чтобы получить гидроксид-ион. Типичные основания являются аминами или азотсодержащими гетероциклами. Характерные основания включают в себя $-N(R^3)(R^4)$, где R^3 и R^4 независимо выбраны из H или C_{1-6} алкила, предпочтительно H или метила,



где R⁵, R⁶, R⁷ и R⁸ в каждом случае независимо выбраны из водорода или C₁₋₆ алкила, предпочтительно H или метила, и e равен 0-4. В некоторых вариантах основание является азотистым основанием.

Термин “антитело” в настоящем изобретении используется в широком смысле и конкретно охватывает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (*например*, биспецифические антитела), и фрагменты антител, которые проявляют желаемую биологическую активность. Интактное антитело содержит первоначально две области: переменную область и постоянную область. Переменная область связывается и взаимодействует с целевым антигеном. Переменная область включает в себя область распознавания комплементарности (CDR), которая распознает и присоединяется к конкретному сайту связывания на специфическом антигене. Постоянная область может быть распознана иммунной системой и взаимодействовать с ней (*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 от любых подходящих видов. В некоторых вариантах реализации антитело имеет человеческое или мышиное

происхождение. Антитело может быть, например, человеческим, гуманизированным или химерным.

Термин “моноклональное антитело” в данном контексте относится к антителу, полученному от популяции в целом гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела высоко специфичны, будучи направлены против отдельного антигенного сайта. Модификатор “моноклональный” указывает на характер антитела как полученного из в основном гомогенной популяции антител, и оно не должно быть интерпретировано как требующее производства антитела каким бы то ни было конкретным методом.

“Интактное антитело” – это антитело, которое содержит антиген-связывающую переменную область, а также константный домен легкой цепи (C_L), константные домены тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4} , в зависимости от класса антитела. Константные домены могут быть константными доменами с нативной последовательностью (*например*, константные домены с нативной последовательностью человека) или вариантом ее аминокислотной последовательности.

“Фрагмент антитела” содержит участок интактного антитела, содержащий его антигенсвязывающую или переменную область. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, и Fv, диатела, триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, scFv, scFv-Fc, фрагменты мультиспецифических антител, образованных из фрагмент(ов) антител, произведенных библиотекой экспрессии Fab, или антидетерминантные фрагменты любого из перечисленного выше, которые иммуноспецифично связываются с целевым антигеном (*например*, антигеном раковой клетки, вирусным антигеном или микробным антигеном).

“Антиген” – частица, с которой специфично связывается антитело.

Термины “специфичное связывание” и “специфично связывается” означают, что антитело или производное антитела будут связываться высокоизбирательным образом со своим соответствующим целевым антигеном, и не с множеством других антигенов. Обычно антитело или производное антитела связывается со сродством 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 заданным антигеном со сродством, которое по меньшей мере в два раза больше, чем его сродство для связывания неспецифичного антигена (*например*, бычьего сывороточного альбумина, казеина), отличного от заданного антигена или близкородственного антигена.

Термин “ингибировать” или “ингибирование” означает уменьшать на

поддающуюся измерению величину или противодействовать чему-то полностью.

Термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству лекарства, эффективного для лечения заболевания или нарушения у млекопитающих. В случае рака, терапевтически эффективное количество лекарства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (*т.е.*, до некоторой степени замедлить и предпочтительно остановить) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (*т.е.*, до некоторой степени замедлить и предпочтительно остановить) метастазы опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; и/или ослаблять до некоторой степени один или более симптомов, ассоциируемых с раком. По степени, до которой лекарство может замедлять рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака эффективность может, например, быть измерена оценкой времени, за которое прогрессирует заболевание (TTP) и/или определением процента пациентов с выраженной реакцией (RR).

Термин “по существу” или “в основном” относится к большинству, *т.е.* >50% от популяции, смеси или образца, предпочтительно более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98%, или 99% популяции.

Термины “внутриклеточно расщепленный” и “внутриклеточное расщепление” относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгате Лиганд-Лекарство (*например*, на Конъюгате Антитело-Лекарство (ADC) или подобном), при этом ковалентное соединение, *например*, линкер, между лекарственной частью (D) и лигандной группой (*например*, антителом (Ab)) разрушается, приводя к высвобождению лекарства или другого метаболита из конъюгата, отделяющегося от антитела внутри клетки. Отщепленные части конъюгата Лекарство – Линкер – Лиганд являются, таким образом, внутриклеточными метаболитами.

Термин “цитотоксическая активность” относится к убивающему клетки, цитостатическому или антипролиферативному действию соединения конъюгата Лекарство – Линкер – Лиганд или внутриклеточного метаболита конъюгата Лекарство – Линкер – Лиганд. Цитотоксическая активность может быть выражена как значение IC₅₀, которое является концентрацией (молярной или массовой) на единицу объема, при которой выживает половина клеток.

Термин “цитотоксическое средство” в данном контексте относится к веществу, которое ингибирует функции клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов (*например*, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ⁶⁰Co, и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических

средств, и токсинов, таких, как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

Термины “рак” и “раковый” относятся к или описывают физиологические состояния или нарушения у млекопитающих, которые обычно характеризуются нерегулируемым ростом клеток. “Опухоль” содержит одну или более раковых клеток.

“Аутоиммунное заболевание” в данном контексте – заболевание или нарушение, возникающее из-за и направленное против собственных тканей и белков индивидуума.

Примеры “пациентов” включают в себя, но не ограничиваются этим, человека, крысу, мышь, морскую свинку, обезьяну, свинью, козла, корову, лошадь, собаку, кошку, птицу и домашнюю птицу. В типичном варианте осуществления пациент - человек.

Термины “лечить” или “лечение,” если из контекста не следует иное, относится к терапевтическому лечению и профилактическим мероприятиям для предотвращения рецидива, при которых целью является ингибирование или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, например, развития или распространения рака. Для целей этого изобретения эффективные или желаемые клинические результаты включают в себя, но не ограничиваются этим, ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (*m.e.*, не-ухудшение) статуса заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение статуса заболевания и ремиссию (частичную или полную), поддающуюся или не поддающуюся обнаружению. “Лечение” может также означать продление выживания по сравнению с ожидаемым сроком выживания без получения лечения. Нуждающиеся в лечении включают в себя тех, кто уже находится в состоянии нарушения, а также тех, кто склонен иметь состояние нарушения.

В случае рака термин “лечение” включает в себя любое или все из: подавление роста клеток опухоли, раковых клеток или опухоли; подавление размножения клеток опухоли или раковых клеток, уменьшение общей массы опухоли или снижение количества раковых клеток, и улучшение одного или более симптомов, связанных с заболеванием.

В случае аутоиммунного заболевания, термин “лечение” включает в себя любое или все из: подавление размножения клеток, связанных с статусом аутоиммунного заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, клетки, которые производят аутоиммунные антитела, уменьшение нагрузки аутоиммунными антителами и улучшение одного или более симптомов аутоиммунного заболевания.

В данном контексте термин “Метка” относится к любой молекуле, которая

производит или может быть стимулирована производить обнаружимый сигнал. Метки, содержащие репортерные молекулы, которые могут быть обнаружены визуализирующим оборудованием, включают в себя, но не ограничиваются этим, радиоактивные, парамагнитные, флуоресцентные или радионепроницаемые химические структурные элементы. В некоторых вариантах реализации Метка будет радиоактивным соединением, хемилюминесцентным агентом, флуоресцентным агентом или хромогеном. В некоторых вариантах реализации Метка будет флуоресцирующей молекулой, такой, как флуорофор.

В данном контексте термин “Стабилизатор” относится к соединению, которое способствует стабильности конъюгата, например, путем повышения общесистемного удержания Лиганда, когда он введен пациенту. Стабилизатор может также повышать растворимость конъюгата в воде. Типичным Стабилизатором является полиэтиленгликоль.

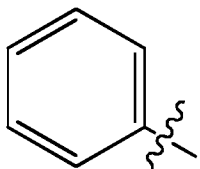
Фраза “фармацевтически приемлемая соль” в данном контексте относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения (*например*, Лекарства, Лекарства-Линкера, или Конъюгата Лиганд-Лекарство). Соединение может содержать по меньшей мере одну аминогруппу, и, таким образом, кислые соли присоединения могут быть образованы аминогруппой. Примеры солей включают в себя, но не ограничиваются этим, сульфаты, трифторацетаты, цитраты, ацетаты, оксалаты, хлориды, бромиды, йодиды, нитраты, бисульфаты, фосфаты, кислые фосфаты, изоникотинаты, лактаты, салицилаты, кислые цитраты, тартраты, олеаты, таннаты, пантотенаты, битартраты, аскорбаты, сукцинаты, малеаты, гентизинаты, фумараты, глюконаты, глюкуронаты, сахараты, формиаты, бензоаты, глутаматы, метансульфонаты, этансульфонаты, бензолсульфонаты, *n*-толуолсульфонаты, и памоаты (*т.е.*, 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоаты)). Фармацевтически приемлемая соль может вовлекать включение другой молекулы, например, ацетат-иона, сукцинат-иона или другого противоиона. Противоион может быть любой органической или неорганической частью молекулы, которая стабилизирует заряд родительского соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может содержать в своей структуре более чем один заряженный атом. В случае, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, она может иметь несколько противоионов. Итак, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Если не указано иное, термин “алкил” сам по себе или как часть другого термина относится к замещенному или незамещенному, с прямой цепью или разветвленному, насыщенному или ненасыщенному углеводороду, содержащему указанное количество

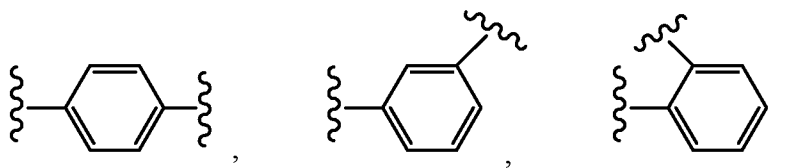
атомов углерода (*например*, “-C₁-C₈ алкил” или “-C₁-C₁₀” алкил относятся к алкильной группе, содержащей от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода, соответственно). Если количество атомов углерода не указано, алкильная группа содержит от 1 до 8 атомов углерода. Типичные “-C₁-C₈ алкильные” группы с прямой цепью включает в себя, 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 в себя, но не ограничиваются этим, -изопропил, -*втор*-бутил, -изобутил, -*трет*-бутил, -изопентил, и -2-метилбутил; ненасыщенные -C₂-C₈ алкилы включают в себя, но не ограничиваются этим, -винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутинил, -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 вариантах реализации алкильная группа не замещена. Алкильная группа может быть замещена одной или более группами. В некоторых вариантах алкильная группа может быть насыщенной.

Если не указано иное, “алкилен,” сам по себе или как часть другого термина, относится к замещенному или незамещенному насыщенному, с прямой цепью или разветвленному, или циклическому углеводородному радикалу с указанным количеством атомов углерода, обычно 1-10 атомов углерода, и имеющим два моновалентных центра радикалов, полученных удалением двух атомов водорода от тех же или двух других атомов углерода родительского алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают в себя, но не ограничиваются этим: метилен (-CH₂-), 1,2-этил (-CH₂CH₂-), 1,3-пропил (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-бутил (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), и т. п. В предпочтительных вариантах алкилен представляет собой разветвленный или прямоцепочечный углеводород (т.е., это не циклический углеводород).

Если не указано иное, “арил” сам по себе или как часть другого термина, означает замещенный или незамещенный моновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал из 6-20 атомов углерода, полученный удалением одного атома водорода от одного атома углерода родительского ароматического кольца. Такие арильные группы показываются в типичных структурах как “Ar”. Типичные арильные группы включают в себя, но не ограничиваются этим, радикалы, произведенные от бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила, и т.п. Типичная арильная группа представляет собой фенильную группу, как ниже:



Если не указано иное, “арилен” сам по себе или как часть другого термина, представляет собой арильную группу, как определено выше, которая содержит две ковалентные связи (т.е., это дивалент) и может быть в орто, мета, или пара конфигурациях, как показано на следующих структурах, с фенилом как типичной группой:



Если не указано иное, “гетероцикл C_3-C_8 ” сам по себе или как часть другого термина, относится к одновалентной замещенной или незамещенной ароматической или неароматической моноциклической или бициклической кольцевой структуре, содержащей от 3 до 8 атомов углерода (также называемых членами кольца) и от одного до четырех гетероатомов – членов кольца, независимо выбранных из N, O, P или S, и полученной удалением одного атома водорода от атома кольца родительской кольцевой системы. Один или более атомов N, S или S в гетероцикле могут быть окислены. Кольцо, которое включает в себя гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не отмечено иное, гетероцикл присоединен к своей боковой группе при любом гетероатоме или атоме углерода, дающем в результате стабильную структуру. Типичные примеры гетероцикла C_3-C_8 включают в себя, 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. “Гетероарил C_3-C_8 ” представляет собой ароматический гетероцикл C_3-C_8 .

Если не указано иное, “ C_3-C_8 гетероцикл” сам по себе или как часть другого термина, относится к C_3-C_8 гетероциклической группе, определенной выше, где один из атомов водорода гетероциклической группы заменен связью (т.е., он двухвалентный). А “ C_3-C_8 гетероарилен,” сам по себе или как часть другого термина, относится к C_3-C_8 гетероарильной группе, определенной выше, где один из атомов водорода гетероарильной группы заменен связью (т.е., он двухвалентный).

Если не указано иное, “карбоцикл C_3-C_8 ” сам по себе или как часть другого

термина, представляет собой 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членное одновалентное замещенное или незамещенное насыщенное или ненасыщенное неароматическое моно- или би-карбоциклическое кольцо, полученное удалением одного атома водорода от одного атома родительской ароматической кольцевой системы. Типичные карбоциклы $\text{-C}_3\text{-C}_8$ включают в себя, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, цикlopентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил.

Если не указано иное, " $\text{C}_3\text{-C}_8$ карбоцикл," сам по себе или как часть другого термина, относится к $\text{C}_3\text{-C}_8$ карбоциклической группе, определенной выше, где другой из атомов водорода карбоциклической группы заменен связью (т.е., он двухвалентный).

Если не указано иное, термин "гетероалкил," сам по себе или в сочетании с другим термином означает, если не сформулировано иначе, стабильный углеводород с прямой или разветвленной цепью, или их сочетание, полностью насыщенный или содержащий от 1 до 3 степеней ненасыщенности, состоящий из определенного числа атомов углерода и от одного до десяти, предпочтительно от одного до трех, гетероатомов выбрано из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы могут по выбору быть окислены и гетероатом азота может по выбору быть кватернизирован. Гетероатом(ы) O, N и S могут быть размещены в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остатку молекулы. Гетероатом Si может быть размещен в любом положении гетероалкильной группы, включая положение, в котором алкильная группа присоединена к остатку молекулы. Примеры включают в себя $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, -CH=CH-O-CH_3 , $\text{-Si(CH}_3\text{)}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH=N-O-CH}_3$, и $\text{-CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$. До двух гетероатомов могут идти подряд, как, например, $\text{-CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ и $\text{-CH}_2\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_3$. В предпочтительных вариантах реализации $\text{C}_1 - \text{C}_4$ гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 4 атомов углерода и 1 или 2 гетероатомов и $\text{C}_1 - \text{C}_3$ гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 3 атомов углерода и 1 или 2 гетероатомов. В некоторых вариантах гетероалкил или гетероалкилен является насыщенным.

Если не указано иное, термин "гетероалкилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает дивалентную группу, производную от гетероалкила (как обсуждалось выше), как в примерах $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ и $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$. Для гетероалкиленовых групп гетероатом может также занимать один или оба конца цепи. Более того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связующих групп не предполагается

ориентации связующей группы.

"Замещенный алкил" и "замещенный арил" означают алкил и арил, соответственно, в которых один или более атомов водорода каждый независимо замещен заместителем. Типичные заместители включают в себя, но не ограничиваются этим, $-X$, $-R$, $-O^-$, $-OR$, $-SR$, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-NRC(=O)R$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-AsO_2H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$, или $-C(=NR)NR_2$, где каждый X независимо является галогеном: $-F$, $-Cl$, $-Br$, или $-I$; и каждый R независимо является $-H$, $-C_1-C_{20}$ алкилом, $-C_6-C_{20}$ арилом, $-C_3-C_{14}$ гетероциклом, защитной группой или пролекарственной функциональной группой. Алкиленовая, карбоциклическая, карбоцикло-, гетероалкильная, гетероалкиленовая, гетероциклическая, гетероцикло-, гетероарильная и гетероариленовая группы, как описано выше, могут также быть подобным образом замещены.

RG - реакционноспособная группа, которая содержит реакционноспособный участок (RS), который способен к образованию связи с обоими компонентами Линкерной группы (т.е., A, W, Y) или Лекарственной группы D. RS - реакционноспособный участок в пределах реакционноспособной группы (RG). Реакционноспособные группы включают в себя сульфгидрильные группы, чтобы образовывать дисульфидные связи или простые тиоэфирные связи, альдегидные, кетонные или гидразиновые группы, чтобы образовывать гидразиновые связи, карбоксильные или аминогруппы, чтобы образовывать пептидные связи, карбоксильные или гидроксигруппы, чтобы образовывать эфирные связи, сульфоновые кислоты, чтобы образовывать сульфонамидные связи, спирты, чтобы образовывать карбаматные связи, и амины, чтобы образовывать сульфонамидные связи или карбаматные связи. Следующая таблица иллюстрирует Реакционноспособные Группы, Реакционноспособные Участки, и типичные функциональные группы, которые могут образоваться после реакции реакционноспособного участка. Таблица не исчерпывающая. Специалист в данной области в полной мере поймет, что указанные как R' и R'' участки в таблице эффективно представляют собой любые органические фрагменты молекул (например, алкильную группу, арильную группу, гетероарильную группу, или замещенную алкильную, арильную или гетероарильную группу), которые совместимы с образованием связи, происходящем при преобразовании Реакционноспособных Групп в одну из Типичных Функциональных Групп. Следует также понимать, что применительно к вариантам реализации настоящего изобретения, R' может представлять собой один или более компонентов самостабилизирующегося

линкера или, по выбору, вторичного линкера, в зависимости от ситуации, и R" может представлять собой один или более компонентов по выбору, вторичного линкера, Лекарственной группы, Стабилизатора или Метки, в зависимости от ситуации.

Реакционноспособная Группа	Реакционноспособный Участок	Типичные Функциональные Группы
1) R'-SH	-S-	R'-S-R" R'-S-S-R"
2) R'-C(=O)OH	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R"
3) R'-C(=O)ONHS	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R"
4) R'S(=O) ₂ -OH	-S(=O) ₂ -	R'S(=O) ₂ NH-R"
5) R'-CH ₂ -X (X is Br, I, Cl)	-CH ₂ -	R'-CH ₂ -S-R"
6) R'-NH ₂	-N-	R'-NHC(=O)R"

Следует понимать, что, однажды прореагировав, реакционноспособный участок может образовывать новую связь с компонентами Линкерной группы или Лекарственной группы, в зависимости от ситуации. Реакционноспособный участок, однажды присоединившись к остатку Линкерной группы, обычно утрачивает свою реакционную способность.

Термин “дилактам” в данном контексте относится к циклическому амиду, который образуется в результате реакции макроциклизации с тиозамещенным сукцинимидом и основанием, присутствующем на самостабилизирующей линкерной области.

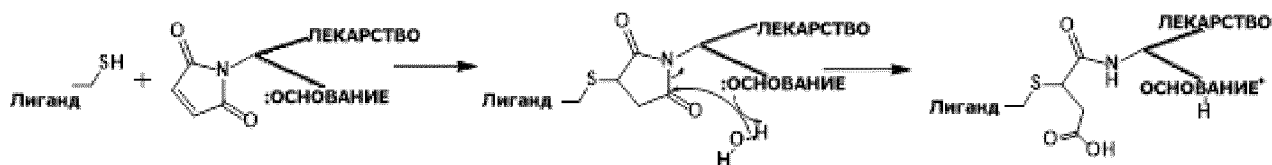
Основная часть

Гидролиз малеимида (или тиозамещенного сукцинимиды) представляет собой реакцию нуклеофильного присоединения, в которой вода, действуя как нуклеофил, атакует один из электрофильных карбонильных атомов углерода малеимидного кольца (или сукцинимидного кольца). На скорость этой реакции влияет электрофильность карбонилов, которая может варьироваться при замещении электронодонорных и электроноакцепторных групп, присутствующих на азоте имидной группы. На скорость реакции гидролиза влияет также pH водного растворителя, который эффективно повышает нуклеофильность воды с повышением pH. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что размещение основной группы на N-замещенном малеимиде также повышает скорость гидролиза. Путем осторожного конструирования N-замещающей группы на малеимиде, сочетание его электроноакцепторного действия на малеимидное кольцо (повышающего его электрофильность) и локализованной основности (повышение эффективной нуклеофильности находящейся поблизости воды) может быть использовано,

чтобы регулировать скорость гидролиза или родительского малеимида, или его тиозамещенного сукцинимидного производного. Настоящее изобретение предлагает, в частности, N-замещенные малеимида со скоростью гидролиза, которая падает в пределах полезного интервала, при этом их реакция с тиолами происходит более быстро, чем их гидролиз до производного яблочной кислоты, но которые приводят к образованию тиозамещенных сукцинимидов со скоростью гидролиза, которая достаточно высока, чтобы достичь полного гидролиза в мягких условиях, что очень удобно для производства биоконъюгатов на основе белков.

Настоящее изобретение основано, в частности, на том неожиданном факте, что основная функциональная группа, ближайшая к малеимиду, будет катализировать гидролиз тиозамещенного сукцинимиды, который образуется при конъюгации малеимида и белкового тиола, приводя к получению стабильного биоконъюгата. При дополнительном сочетании ближайшей основной группы и электроноакцепторной группы скорость гидролиза тиозамещенного сукцинимидного кольца может быть отрегулирована до желаемого уровня. Расчетные величины, которые влияют на скорость гидролиза, включают в себя рКа основной группы, силу электроноакцепторной группы, если она присутствует, и близость обеих групп к карбонильному углероду малеимида. Расчетные величины, которые влияют на процент гидролиза, включают в себя природу и близость основания к карбонильному углероду малеимида.

В принципе, без ограничения объема настоящего изобретения, Линкерная группа, содержащая самостабилизирующуюся линкерную область, называется в настоящем документе Самостабилизирующийся Линкер или Самостабилизирующаяся Линкерная группа. Самостабилизирующийся Линкер перед конъюгацией с Лигандной группой содержит малеимидную группу. Самостабилизирующийся Линкер является самостабилизирующимся в силу близости малеимидной группы к основанию в пределах Линкерной группой, которая катализирует гидролиз своего собственного тиозамещенного сукцинимиды после конъюгации с Лигандной группой. Это схематически представлено ниже:



Следует понимать, что термин Самостабилизирующийся Линкер относится к Линкерной группе как до, так и после стабилизации.

На основании вышеизложенного настоящее изобретение в одной группе вариантов реализации описывает Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство, содержащий

Лигандную группу и по меньшей мере одно Функциональное Средство, выбранное из Лекарственной группы, Метки, или Стабилизатора, в котором Лигандная группа и каждое из Функциональных Средств соединены самостабилизирующей линкерной областью, содержащей сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо, непосредственно присоединенное к Лигандной группе простой тиоэфирной связью; и основание и электроноакцепторную группу (присоединенная к Лигандной группе через сукцинимид), функционально связанные, чтобы стабилизировать конъюгат в плазме относительно конъюгата лиганд-лекарство, не имеющего самостабилизирующей линкерной области (т.е. повышением скорости гидролиза сукцинимидного кольца). В некоторых вариантах электроноакцепторную группу располагают так, чтобы повысить электрофильность сукцинимиды, делая его более способным реагировать с водой, а основание располагают так, чтобы способствовать гидролизу сукцинимидного кольца (например, по механизму внутримолекулярного основного катализа). В некоторых вариантах вместо сукцинимидного кольца образуется дилактам, если основание реагирует с сукцинимидным кольцом. В другой группе вариантов реализации предлагаются группы Линкер – Функциональное средство, в которых Линкерный участок содержит самостабилизирующую линкерную область. В другой группе вариантов реализации предлагаются конъюгаты Лиганд-Линкер, в которых Линкерный участок содержит самостабилизирующую линкерную область. В некоторых вариантах реализации Линкерный участок дополнительно содержит необязательную вторичную линкерную область (L^0).

В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представляет собой Конъюгат Лиганд-Лекарство. Таким образом, настоящее изобретение предлагает в одной группе вариантов реализации Конъюгат Лиганд – Лекарство, содержащий Лигандную группу и по меньшей мере одну Лекарственную группу, в котором Лигандная группа и каждая из Лекарственных групп соединены самостабилизирующей линкерной областью, содержащей сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо, непосредственно присоединенное к Лигандной группе простой тиоэфирной связью; и основание и электроноакцепторную группу (присоединенную к Лигандной группе через сукцинимидное кольцо), функционально связанные, чтобы стабилизировать конъюгат в плазме относительно конъюгата лиганд-лекарство, не имеющего самостабилизирующей линкерной области (т.е. повышением скорости гидролиза сукцинимидного кольца). В некоторых вариантах электроноакцепторную группу располагают так, чтобы повысить электрофильность сукцинимиды, делая его более способным реагировать с водой, а основание располагают так, чтобы способствовать

гидролизу сукцинимидного кольца (например, по механизму внутримолекулярного основного катализа). В некоторых вариантах вместо сукцинимидного кольца образуется дилактам, если основание реагирует с сукцинимидным кольцом. В другой группе вариантов реализации предлагаются группы Лиганд – Линкер, в которых Линкерный участок содержит самостабилизирующуюся линкерную область. В другой группе вариантов реализации предлагаются конъюгаты Лиганд-Линкер, в которых Линкерный участок содержит самостабилизирующуюся линкерную область. В некоторых вариантах реализации Линкерный участок дополнительно содержит необязательную вторичную линкерную область (L^O). В некоторых вариантах реализации необязательная вторичная линкерная область представляет собой высвобождаемую линкерную область (L^R), которая содержит Отщепляемую группу и необязательно один или более Расширитель и Разделительную группу. В некоторых других вариантах реализации необязательная вторичная линкерная область представляет собой невысвобождаемую линкерную область (L^N), которая содержит один или более Расширитель и Разделительную группу. В еще других вариантах реализации изобретение раскрывает способы лечения рака, иммунных заболеваний, инфекционных заболеваний и других заболеваний и нарушений, используя Конъюгат Лиганд – Лекарство, содержащий самостабилизирующуюся линкерную область.

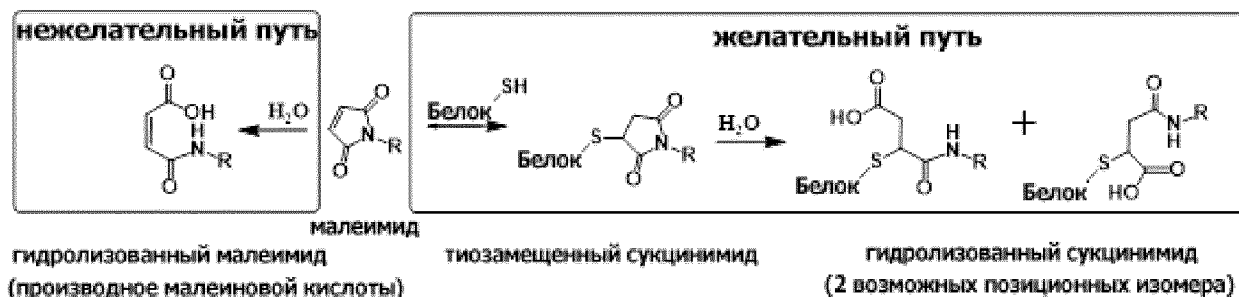
Линкерная группа Конъюгата Лиганд-Функциональное Средство (или Конъюгата Лиганд-Лекарство) может, кроме того, содержать в дополнение к самостабилизирующейся линкерной области необязательную вторичную линкерную область (L^O) которая присоединяет каждое Функциональное средство (или Лекарственную группу) к самостабилизирующейся линкерной области. Вторичная линкерная область может быть высвобождаемой линкерной областью или невысвобождаемой линкерной областью.

Термин Линкерная группа может быть использован в этом документе, чтобы обозначить линкерный участок Конъюгата Лиганд-Функциональное Средство (или Конъюгата Лиганд-Лекарство), содержащий самостабилизирующуюся линкерную область и необязательную вторичную линкерную область.

Самостабилизирующаяся Линкерная Область

Самостабилизирующиеся Линкеры сконструированы так, что скорость пост-конъюгационного гидролиза сукцинимидного кольца будет контролируемой и будет снижаться в пределах желаемого интервала. Границы этого интервала обычно диктуются задачей, которую нужно решить при производстве конъюгатов лиганд-лекарство. С другой стороны, гидролиз, который протекает слишком медленно, потребовал бы неприемлемых задержек в процессе производства, или агрессивных условий pH и

температуры, которые могут вызвать повреждение белковой основы. В противоположность этому, малеимид, который слишком быстро реагирует с водой, может быть гидролизован до соответствующего производного яблочной кислоты до того, как он сможет вступить в реакцию с доступными белковыми тиолами (см. Нежелательный путь):

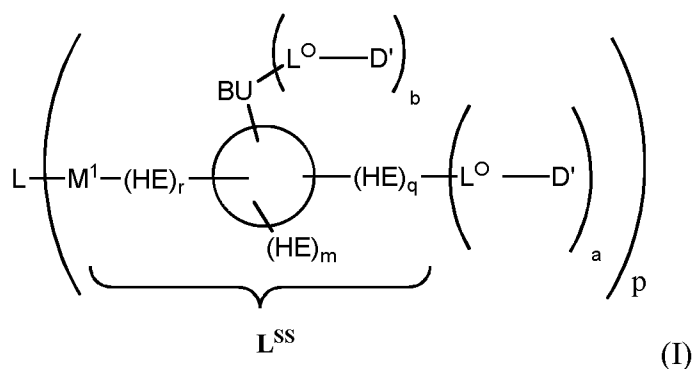


Такие производные малеиновой кислоты не реагируют с тиолами, и поэтому этот путь реакции не приводит к получению биоконъюгата. Следовательно, малеимиды, которые подвергаются гидролизу быстрее, чем происходит добавление тиолов в применимых условиях, не являются пригодными реагентами. В целом, структурные особенности, которые повышают процент гидролиза тиозамещенного сукцинимиды, будут также повышать процент гидролиза родительского малеимида.

При конструировании Самостабилизирующих Линкеров по настоящему изобретению следует понимать, что рКа основной группы, сила электроноакцепторной группы(групп) и близость обеих групп к малеимиду – взаимозависимые переменные и будут влиять на скорость гидролиза как малеимида, так и соответствующего тиозамещенного сукцинимидного продукта. Таким образом, размещение электроноакцепторной группы и основания будет зависеть от рКа основания и силы электроноакцепторной группы(групп). Специалисты поймут, что для особенно сильных электроноакцепторных групп, таких, как фтор-, трифторметил, и нитро-, группа может находится дальше от малеимида. В некоторых вариантах реализации реакция гидролиза может завершиться реакцией макрокристаллизации, так что получаемые в результате конъюгаты будут содержать гетерогенную смесь гидролизованных тиозамещенных сукцинимидных конъюгатов и циклизированных тиозамещенных дилактамовых конъюгатов. В предпочтительных вариантах реализации дилактамы образовываться не будут.

Некоторые варианты осуществления изобретения

В некоторых вариантах реализации Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой I:



или его солью (например, его фармацевтически приемлемой солью);

где

L - Лигандная группа;

D' - Лекарственная группа, Метка или Стабилизатор;

L^O - необязательная вторичная линкерная область; и

L^{SS} - самостабилизирующаяся линкерная область, в которой

M¹ - сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид или вместе с BU образует дилактам;

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил, и, необязательно, содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или D';

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма m + q + r равна 0, 1 или 2 при условии, что если m + q + r равны 0, остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил;

индекс a и b каждый равны 0 или 1, и сумма a+b равна 1; и

индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20.

В некоторых вариантах если r равен 1, HE не содержит карбонильную группу (т.е., C(=O))

В некоторых вариантах r равен нулю. В некоторых вариантах a равен 1 и b равен нулю. В других вариантах a равен нулю и b равен 1.

В некоторых вариантах m + q + r равно 0. В таких вариантах остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил и действует как электроноакцепторная группа. Типичные арилы и гетероарилы включают в себя фенил и пиридинил.

В некоторых вариантах m + q + r равен 1 или 2.

В некоторых вариантах Конъюгат представлен Формулой I или его солью, при этом a равен 1 и r равен нулю.

В некоторых вариантах Конъюгат представлен Формулой I или его солью, в которой L^O присутствует и представляет собой высвобождаемую линкерную область, круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен), а равен 1, г равен нулю, и сумма $m+q$ равна 1. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.

В некоторых вариантах Конъюгат представлен Формулой I или его солью, в которой L^O присутствует и представляет собой высвобождаемую линкерную область, круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен), а равен 1, и m и г равны нулю. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.

В некоторых вариантах Конъюгат представлен Формулой I или его солью, в которой L^O присутствует и представляет собой высвобождаемую линкерную область, круг обозначает остов, который представляет собой C_1 , C_2 , C_3 или C_4 алкилен с прямой или разветвленной цепью, а равен 1, г равен нулю, и сумма $m+q$ равна 1.

В некоторых вариантах Конъюгат представлен Формулой I или его солью, в которой L^O присутствует и представляет собой высвобождаемую линкерную область, круг обозначает остов, который представляет собой C_1 , C_2 , C_3 или C_4 алкилен с прямой или разветвленной цепью, а равен 1, и m и г равны нулю.

В некоторых вариантах имеется не менее, чем 2 и не более, чем 6 промежуточных атомов между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимиды (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама и имеется не более, чем 5 атомов, не более, чем 4 атома, не более, чем 3 атома, или не более, чем 2 промежуточных атома между электроноакцепторной группой и атомом азота сукцинимидного кольца (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама.

В каждом из этих вариантов реализации алкиленовая или гетероалкиленовая цепь может быть прямой или разветвленной. В некоторых вариантах алкиленовая или гетероалкиленовая цепь будет прямой цепью. В других вариантах она будет разветвленной.

В каждом из этих вариантов реализации p может варьироваться от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12, даже более предпочтительно от 1 до 10, или от 1 до 8.

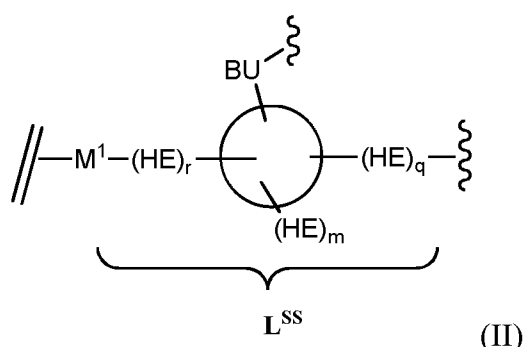
В каждом из этих вариантов реализации M^1 представляет собой предпочтительно сукцинимидное кольцо (т.е., негидролизованное) или гидролизованное сукцинимидное

кольцо (также обозначаемое здесь как гидролизированный сукцинимид).

В каждом из этих вариантов реализации D' может быть Лекарственной группой, D, и Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство может быть Конъюгатом Лиганд-Лекарство.

В некоторых вариантах, в которых сам остов непосредственно присоединен к необязательной вторичной линкерной области или D', (например, в отдельных вариантах реализации когда q равен нулю или когда q равен нулю и r равен нулю), остов будет содержать реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или D'.

В некоторых вариантах реализации самостабилизирующаяся линкерная область (L^{SS}) представлена Формулой II:



или ее солью (например, фармацевтически приемлемой солью), в которой волнистые линии показывают точки присоединения необязательной вторичной линкерной области к D' или D, в которой // показывает точку присоединения к Лигандной Группе. В приведенной выше самостабилизирующейся линкерной области M¹ представляет собой сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо или дилактам, образованный при реакции основания с сукцинимидным кольцом, BU - Основная группа, HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу, и круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области, D', или D; и индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма m + q + r равна 0, 1 или 2 при условии, что если m + q + r равна 0, остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил.

В некоторых вариантах если r равен 1, HE не содержит карбонильную группу (т.е., C(=O))

В некоторых вариантах самостабилизирующаяся линкерная область представлена Формулой II, в которой r равен нулю.

В некоторых вариантах m + q + r равна 0. В таких вариантах C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил действуют как электроноакцепторная группа. Типичные арилы и

гетероарилы включают в себя фенил и пиридинил.

В некоторых вариантах $m + q + r$ равен 1 или 2.

В некоторых вариантах самостабилизирующаяся линкерная область представлена Формулой II или ее солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или гетероалкилен), r равен нулю, и сумма $m+q$ равна 1. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен является алкиленом с прямой или разветвленной цепью.

В некоторых вариантах самостабилизирующаяся линкерная область представлена Формулой II или ее солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или гетероалкилен) и m и r равны нулю. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен является алкиленом с прямой или разветвленной цепью.

В некоторых вариантах самостабилизирующаяся линкерная область представлена Формулой II или ее солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_1 , C_2 , C_3 , или C_4 алкилен с прямой или разветвленной цепью, r равен нулю, и сумма $m+q$ равна 1.

В некоторых вариантах самостабилизирующаяся линкерная область представлена Формулой II или ее солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_1 , C_2 , C_3 , или C_4 алкилен с прямой или разветвленной цепью, и m и r равны нулю.

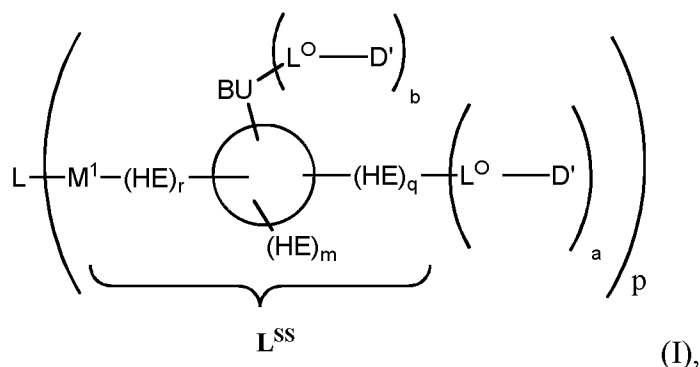
В некоторых вариантах имеется не менее, чем 2 и не более, чем 6 промежуточных атомов между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимиды (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама и имеется не более, чем 5 атомов, не более, чем 4 атома, не более, чем 3 атома, или не более, чем 2 промежуточных атома между электроноакцепторной группой и атомом азота сукцинимидного кольца (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама.

В каждом из этих вариантов реализации алкиленовая или гетероалкиленовая цепь будет предпочтительно прямой или разветвленной цепью. В некоторых вариантах алкиленовая или гетероалкиленовая цепь будет прямой цепью. В других вариантах она будет разветвленной цепью.

В каждом из этих вариантов реализации M^1 представляет собой предпочтительно сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо.

В каждом из этих вариантов реализации D' представляет собой предпочтительно D , Лекарственную группу.

Возвращаясь к вариантам реализации изобретения, в которых Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство имеет формулу (I):



или его соли, в которой каждый из остова, L, M¹, HE, BU, L^O, D', и индексов p, a, b, m, q и r имеет значения, приведенные выше, отдельные варианты реализации включают в себя те, в которых:

- 1) m равен 1, и q и r равны 0;
- 2) q равен 1, и m и r равны 0;
- 3) r равен 1, и m и q равны 0;
- 4) m равен 1, q и r равны 0, и a равен 1;
- 5) q равен 1, m и r равны 0, и a равен 1;
- 6) r равен 1, m и q равны 0, и a равен 1;
- 7) m равен 1, q и r равны 0, и D' - Лекарственная группа, D ;
- 8) q равен 1, m и r равны 0, и D' - Лекарственная группа, D ;
- 9) r равен 1, m и q равны 0, и D' - Лекарственная группа, D ;
- 10) m равен 1, q и r равны 0, a равен 1, и D' - Лекарственная группа, D ;
- 11) q равен 1, m и r равны 0, a равен 1, и D' - Лекарственная группа, D ; или
- 12) r равен 1, m и q равны 0, a равен 1, и D' - Лекарственная группа, D .

В других отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше, Основная группа (BU) содержит первичный, вторичный амин или четвертичный амин. В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше, Основную группу выбирают из группы, состоящей из $-(C(R^9)(R^{10}))_xNH_2$, $-(C(R^9)(R^{10}))_xNHR^a$, и $-(C(R^9)(R^{10}))_xNR^a_2$, где x - целое число от 0-4 (или от 1 до 4) и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что если x равен нулю,

имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама, и каждый R^9 и R^{10} независимо выбран из H или C_{1-3} алкила. В еще одних конкретных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше, Основную группу выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0 до 6 (предпочтительно 0 до 4, или от 1 до 4) при условии, что если x равен нулю, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу. В еще одних отдельных вариантах реализации x - целое число от 1 до 4. В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше, Основная группа представляет собой $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ при условии, что если Основная группа - $-NH_2$, то имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама.

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на отдельных вариантах реализации из п. 2), 5), 8), и 11) выше и включая основанные на вариантах реализации в предшествующих абзацах, НЕ предпочтительно содержит карбонильную, сульфонильную или фосфорильную группу.

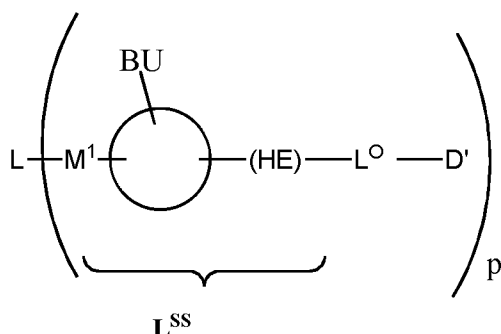
В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше (например, каждый из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше и включая основанные на отдельных вариантах реализации в предшествующих абзацах, имеется не менее, чем 2 и не более, чем 6 промежуточных атомов между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама и имеется не более, чем 5 атомов, не более, чем 4 атома, не более, чем 3 атома, или не более, чем 2 промежуточных атома между электроноакцепторной группой и атомом азота сукцинимидного кольца (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама.

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше (например, каждый из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше) и включая основанные на

отдельных вариантах реализации в предшествующих абзацах, M^1 представляет собой сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид.

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше (например, каждый из отдельных вариантов реализации 1), 2) 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11), и 12) выше) и включая основанные на отдельных вариантах реализации в предшествующих абзацах, круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен). В некоторых таких вариантах алкилен является алкиленом с прямой или разветвленной цепью.

В еще одних отдельных вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Функциональное Средство имеют формулу:



или представляют собой его фармацевтически приемлемую соль, в которой каждый из остова, L, M^1 , HE, BU, L^0 , D', и индекса p имеет значение, приведенное выше, отдельные варианты реализации включают в себя те, в которых:

1) Основная группа (BU) содержит первичный, вторичный амин или четвертичный амин, и D' является предпочтительно Лекарственной группой D.

2) Основную группу выбирают из группы, состоящей из $-(C(R^9)(R^{10}))_xNH_2$, $-(C(R^9)(R^{10}))_xNHR^a$, и $-(C(R^9)(R^{10}))_xNR^a_2$, где x - целое число от 0 до 4 (или 1-4) и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что если x равен нулю, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама, и R^9 и R^{10} независимо выбраны из H или C_{1-3} алкила, и D' является предпочтительно Лекарственной группой D.

3) Основную группу выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0 до 6 (предпочтительно от 0 до 4 или 1 до 4) при условии, что если x равен нулю, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или

негидролизованного) или дилактама, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, и D' является предпочтительно Лекарственной группой D. В еще одних отдельных вариантах реализации X целое число от 1 до 4.

4) Основная группа представляет собой $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ при условии, что если Основная группа представляет собой $-NH_2$, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама; и D' является предпочтительно Лекарственной группой D.

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, HE содержит карбонильную, сульфонильную или фосфорильную группу, и D' является предпочтительно Лекарственной группой D.

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, имеется не менее, чем 2 и не более, чем 6 промежуточных атомов между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимида (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама и имеется не более, чем 5 атомов, не более, чем 4 атома, не более, чем 3 атома, или не более, чем 2 промежуточных атома между электроноакцепторной группой и атомом азота сукцинимидного кольца (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама, и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D).

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, M^1 представляет собой сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид, и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D).

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен), и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D). В некоторых таких вариантах алкилен является алкиленом с прямой или разветвленной цепью.

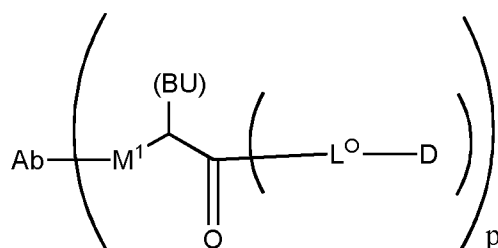
В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, HE является карбонилем, и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D).

В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, HE является карбонилем, и круг обозначает

остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен) с прямой цепью, и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D).

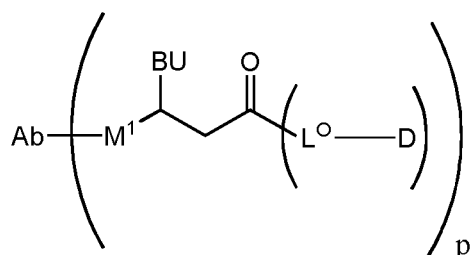
В еще одних отдельных вариантах реализации включая основанные на каждом из отдельных вариантов реализации выше, НЕ является карбонилем, и круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен) с разветвленной цепью, и D' является предпочтительно Лекарственной группой (D).

В еще одних отдельных вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Лекарство имеют формулу:



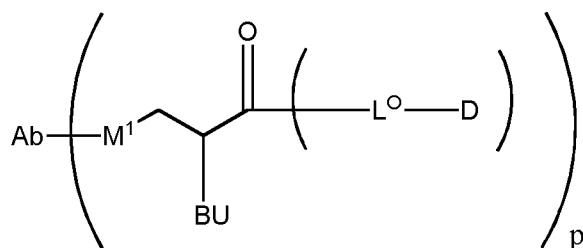
или представляют собой его фармацевтически приемлемую соль, в котором Лигандный участок является антителом (Ab), индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 12), и M^1 , BU, L° такие, как описано в любом из вариантов реализации предложенных здесь, и D - Лекарственная группа. Например, в некоторых вариантах L° - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 1-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу. В еще других вариантах L° - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах антитело Ab может быть заменено белком, не являющимся антителом. M^1 представляет собой предпочтительно сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо.

В еще одних отдельных вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Лекарство имеют формулу:



или представляют собой его фармацевтически приемлемую соль, в которой Лигандный участок является антителом (Ab) и индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 12) и M^1 , BU, и L^O такие, как описано в любом из вариантов реализации предложенных здесь, и D - Лекарственная группа. Например, в некоторых вариантах L^O - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 1-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу. В еще других вариантах L^O - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах антитело Ab может быть заменено белком, не являющимся антителом. M^1 представляет собой предпочтительно сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо.

В еще одних отдельных вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Лекарство имеют формулу:



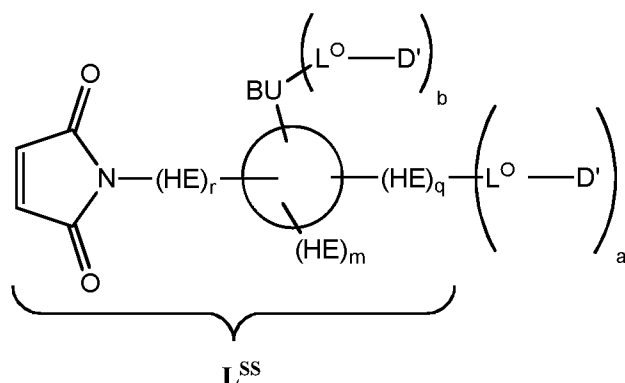
или представляют собой его фармацевтически приемлемую соль, в которой Лигандный участок является антителом (Ab), индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 12), и M^1 , BU, и L^O такие, как описано в любом из вариантов реализации предложенных здесь, и D - Лекарственная группа. Например, в некоторых вариантах L^O - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу. В еще других вариантах L^O - высвобождаемая линкерная область, и BU - $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, или $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах антитело Ab может быть заменено белком, не являющимся антителом. M^1 представляет собой предпочтительно сукцинимидное кольцо или гидролизованное сукцинимидное кольцо.

Описав ряд Конъюгатов Лиганд-Функциональное средство и Конъюгатов Лиганд-Лекарство, раскрываемых в настоящем описании, специалист в данной области во всей

полноте оценит, что различные комбинации компонентов также полезны. Таким образом, настоящее изобретение раскрывает Конъюгаты Функциональное средство - Линкер (например, Конъюгаты Лекарство-Линкер), Линкеры, и области Лиганд-Линкер.

Конъюгаты Линкер-Функциональное средство

В другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает Конъюгаты Линкер-Функциональное средство (например, Конъюгаты Лекарство-Линкер), имеющие формулу:



или их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где

D' - Лекарственная группа, Метка или Стабилизатор;

L^O - необязательная вторичная линкерная область; и

L^{SS} - самостабилизирующаяся линкерная область, где

BU - Основная группа;

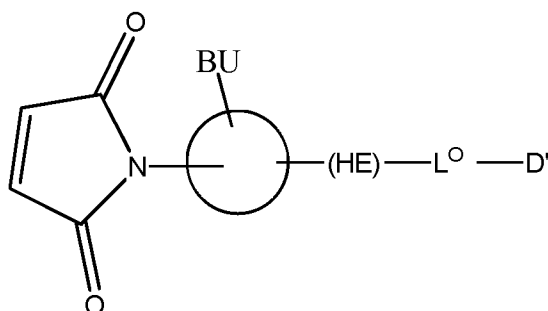
HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или D' ;

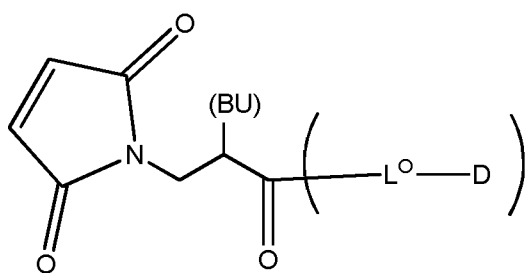
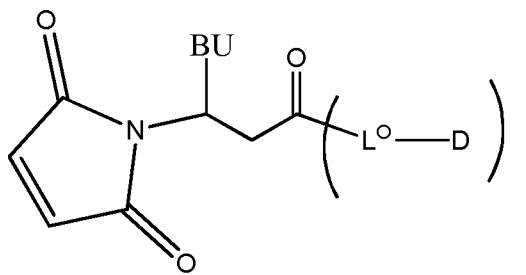
индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма $m + q + r$ равна 0, 1 или 2 при условии, что если $m + q + r$ равно 0, остов представляет собой C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарилен, и

индекс a и b каждый равны 0 или 1, и сумма $a+b$ равна 1.

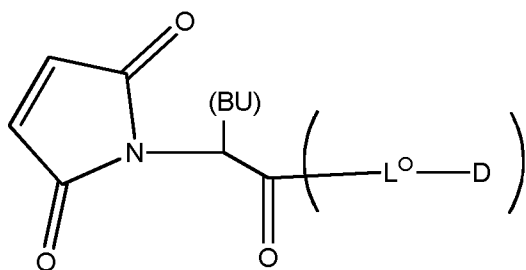
В некоторых отдельных вариантах реализации Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство изображается формулой:



или представляет собой его соль, тогда как в других отдельных вариантах реализации Конъюгат Лекарство-Линкер изображается формулой:



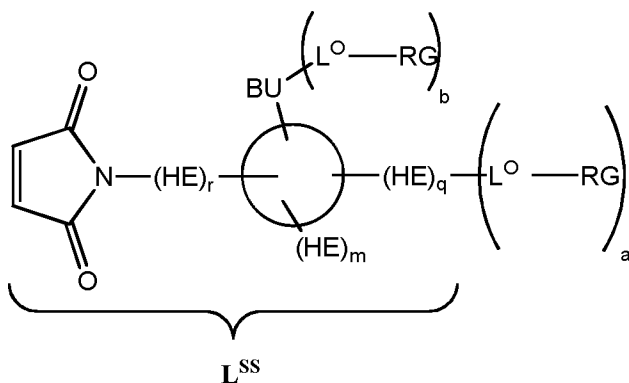
или



или представляет собой его соль, в которой круг, HE, BU, L^{O} и D' имеют значения, предлагаемые здесь для Формулы I и D - Лекарственная группа. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для круга, HE, BU, L^{O} и D' (для Формулы I или любого из конъюгатов, предложенных в этом документе) в равной степени применим к этим Конъюгатам Лекарство-Линкер. В предпочтительных вариантах D' - Лекарственная группа, D.

Линкеры

Также в настоящем изобретении предлагаются Линкеры, имеющие формулу:



или их соль (например, фармацевтически приемлемая соль), где

RG - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на конце L^O , пригодная для присоединения Лекарственной группы;

L^O - необязательная вторичная линкерная область, которая присутствует; и

L^{SS} - самостабилизирующаяся линкерная область, где

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

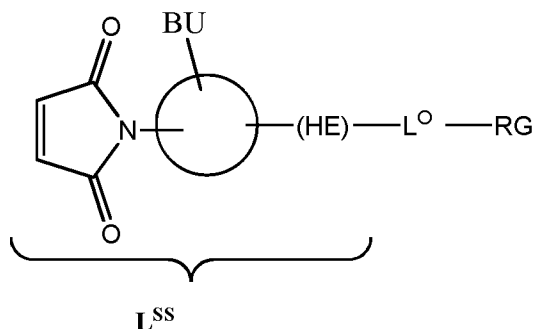
круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарил, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группе;

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма $m + q + r$ равна 0, 1 или 2 при условии, что если $m + q + r$ равна 0, остов представляет собой C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарил; и

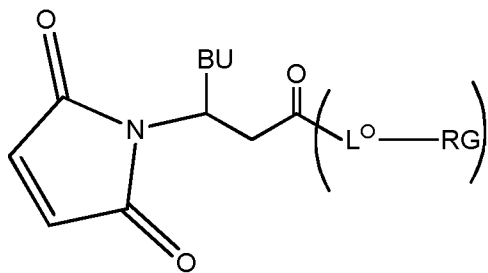
индекс a и b каждый равны 0 или 1, и сумма $a+b$ равна 1.

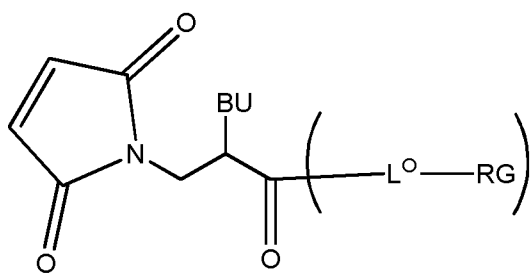
В некоторых вариантах, в которых Линкер присоединен к Метке или Стабилизатору, RG является реакционноспособной группой, которая содержит реакционноспособный участок, который способен к образованию связи с Меткой или Стабилизатором вместо Лекарственной группы.

В некоторых отдельных вариантах реализации Линкер изображается формулой:

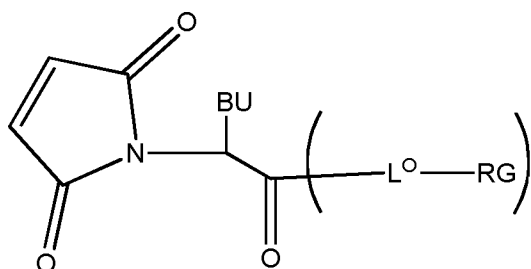


или представляет собой его соль, тогда как в других отдельных вариантах реализации Линкер изображается формулами:





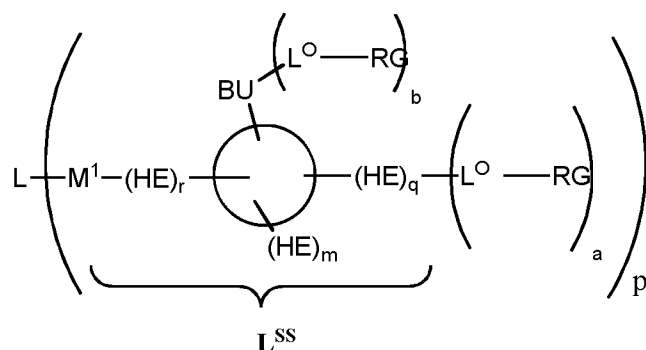
или



или представляет собой его соль (например, фармацевтически приемлемую соль), в которой круг, HE, BU, L^o и RG имеют значения, предложенные выше. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для BU, L^o и RG (для любого из конъюгатов, предложенных в этом документе) в равной степени применим к этим Линкерам.

Конъюгаты Лиганд-Линкер

Также в этом документе предлагаются Конъюгаты Лиганд-Линкер, имеющие формулу:



или их соль (например, фармацевтически приемлемая соль), где

L - Лигандная группа;

индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20;

RG - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на конце L^o, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы;

L^o - необязательная вторичная линкерная область, которая присутствует; и

L^{SS} представляет собой самостабилизирующуюся линкерную область, где

M¹ - сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид;

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

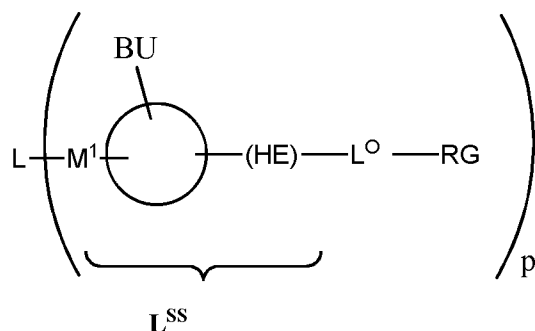
круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и обязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группе;

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма m + q + r равна 0, 1 или 2 при условии, что если m + q + r равна 0, остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен; и

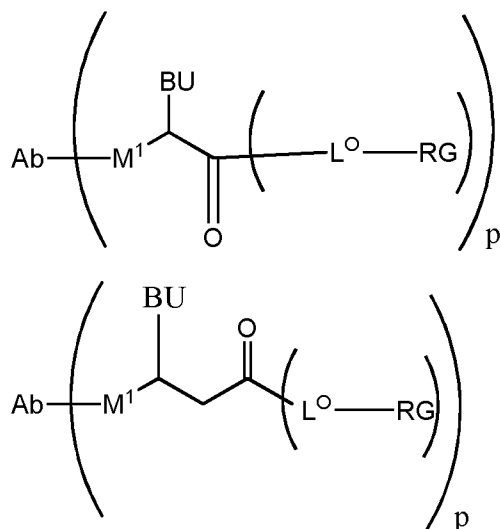
индекс a и b каждый равны 0 или 1, и сумма a+b равна 1.

В некоторых вариантах, в которых Конъюгат Лиганд-Линкер присоединен к Метке или Стабилизатору вместо Лекарственной группы, RG является реакционноспособной группой, которая содержит реакционноспособный участок, который способен к образованию связи с Меткой или Стабилизатором вместо Лекарственной группы.

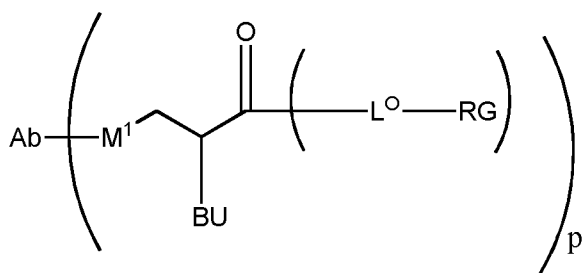
В некоторых отдельных вариантах реализации Конъюгат Лиганд-Линкер изображается формулой:



или представляет собой его соль, тогда как в других отдельных вариантах реализации Конъюгат Лиганд-Линкер изображается формулой:

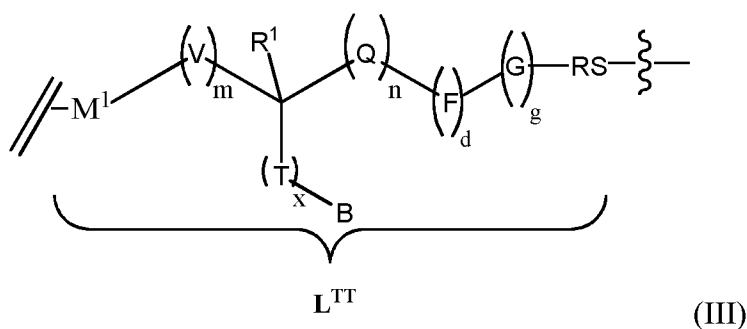


или



или представляет собой его соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где L представляет собой антитело (Ab), и круг, HE, M¹, BU, L^O и RG имеют значения, предложенные выше. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для Ab, M¹, BU, L^O и RG (для любого из конъюгатов, предложенных в этом документе) в равной степени применим к этим конъюгатам Лиганд-Линкер.

В некоторых вариантах реализации изобретения самостабилизирующаяся линкерная область, вместо того, чтобы быть представленной структурой L^{SS}, представлена структурой L^{TT} и имеет формулу (III):



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где волнистые линии указывают точки присоединения необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группы и где // показывает точку присоединения к Лигандной группе;

где M¹ представляет собой негидролизированный или гидролизированный сукцинимид или M¹ образует дилактам с B (например, дилактам образуется, когда B реагирует с сукцинимидным кольцом), где сукцинимид или дилактам сконъюгированы с Лигандной группе простой тиоэфирной связью;

V, Q, T, и G независимо выбраны из $-(C(R^9)(R^{10}))_n-$;

R¹ является H или C₁₋₃ алкилом;

R⁹ и R¹⁰ в каждом случае независимо выбраны из H или C₁₋₃ алкила;

F - C(E¹)(E²) где E¹ и E² независимо выбраны из водорода, электроноакцепторной группы E¹ и E² вместе составляют (=O);

RS - реакционноспособный участок для конъюгации с компонентом необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группы;

g - от 0 до 5;

m - от 0 до 5;

n - от 0 до 5;

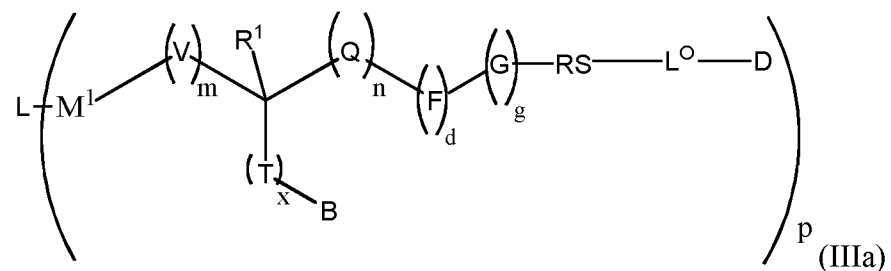
d равен 0 или 1;

x - от 0 до 4, предполагая, что если m равен 0, x равен от 1 до 4;

и b является основанием.

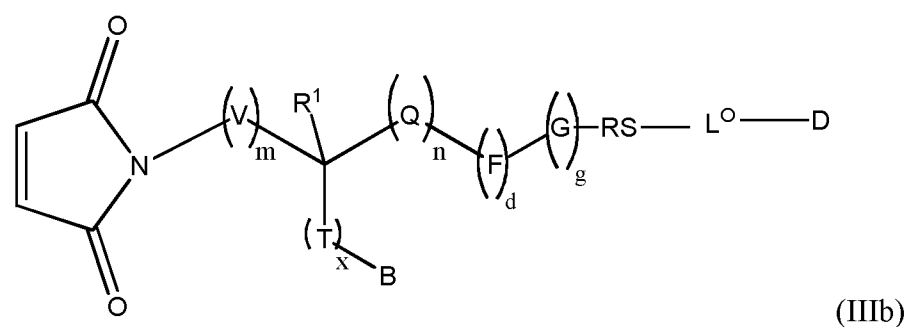
В некоторых вариантах имеется от 1 до 20 лекарство-линкеры, присоединенных к каждой Лигандной группе.

В отдельных вариантах реализации конъюгаты Лиганд-Лекарство имеют формулу:



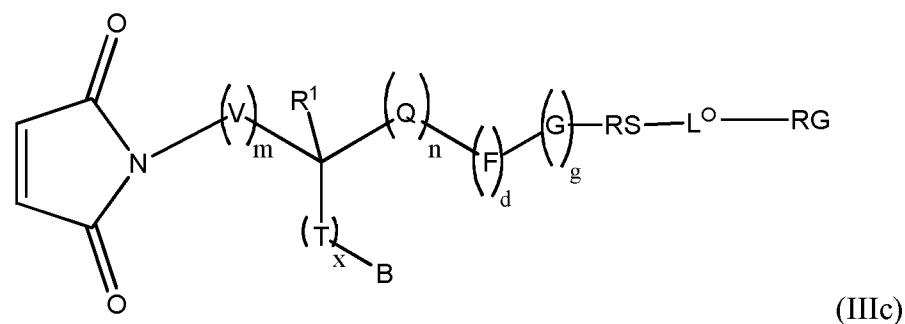
или представляет собой их фармацевтически приемлемую соль.

В отдельных вариантах реализации Лекарство-линкеры имеют формулу:



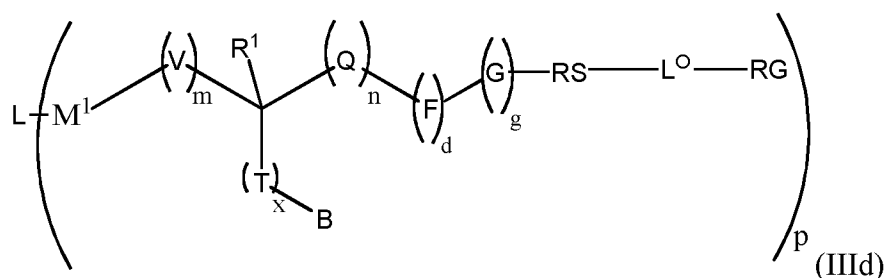
или представляют собой их фармацевтически приемлемую соль.

В отдельных вариантах реализации Линкеры имеют формулу



или представляют собой их фармацевтически приемлемую соль.

В отдельных вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Линкер имеют формулу:



или представляют собой их фармацевтически приемлемую соль.

В формулах IIIa, IIIb, IIIc, и IIId или их фармацевтически приемлемых солях:

L, если присутствует, - Лигандная группа;

L^0 - необязательная вторичная линкерная область;

RG, если присутствует, - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на конце L^O, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы;

М¹, если присутствует, - негидролизированный или гидролизированный сукцинимид или М¹ образует дилактам с В (например, дилактам образуется, когда основание реагирует с сукцинимидным кольцом), где сукцинимид или дилактам сконъюгированы с Лигандной группой простой тиоэфирной связью;

V, Q, T , и G независимо выбраны из $-(C(R^9)(R^{10}))_-$;

R¹ является H или C₁₋₃ алкилом;

R^9 и R^{10} в каждом случае независимо выбраны из H или C_{1-3} алкила;

F - C(E¹)(E²), где E¹ и E² независимо выбраны из водорода, электроноакцепторной группы или E¹ и E² вместе составляют (=O);

RS - реакционноспособный участок для конъюгации с компонентом
необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группы;

g - от 0 до 5;

m - от 0 до 5;

n - от 0 до 5;

d равен 0 или 1;

x равен 0 до 4, при условии, когда m равен 0, x равен от 1 до 4;

р, если присутствует, находится в интервале от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12;

и $\bar{b}$ является основанием.

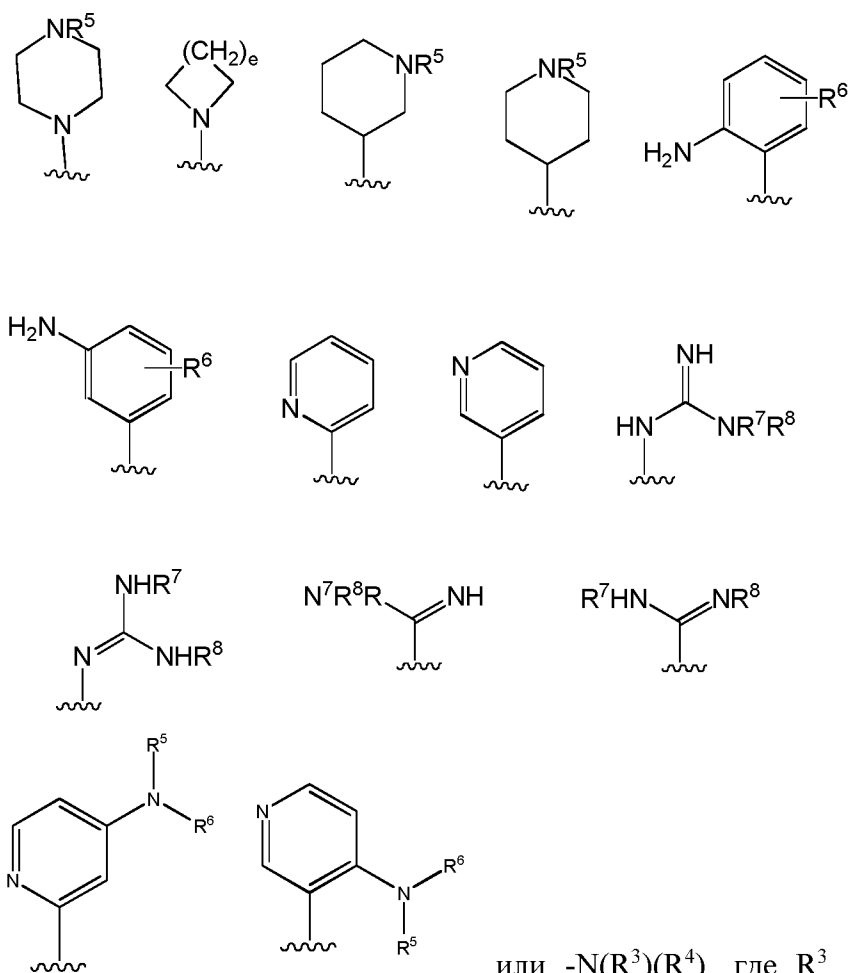
Следует понимать, что для Формулы III (включая IIIa, IIIb, IIIc, и IIId) и их фармацевтически приемлемых солей, электроноакцепторная группа будет представлена или F (например, E¹, E² или E¹ и E²) или реакционноспособным участком RS. Например, когда d равен нулю, или когда E¹ и E² являются водородом, реакционноспособный участок

будет действовать как электроноакцепторная группа. В некоторых вариантах, когда d равен нулю, $RS - C(=O)-$. В некоторых вариантах n , d , и g равны нулю или m , n , d , и g равны нулю и $RS - C(=O)-$.

Типичные варианты реализации в которых конъюгаты Лиганд-Лекарство, Лекарство-Линкеры, Линкеры или конъюгаты Лиганд-Линкер представлены Формулой III (или формулами IIIa, IIIb, IIIc, или IIId, в зависимости от ситуации) или их фармацевтически приемлемой солью, включая те, в которых m равен нулю; m равен нулю и n равен нулю, одному, двум или трем; x равен 1; x равен нулю и n равен нулю, одному, двум или трем; и m равен нулю, n равен нулю, и x равен 1. Типичные варианты реализации включают в себя описанные в настоящем документе, в которых R^9 и R^{10} являются водородом. Типичные варианты реализации включая те, в которых E^1 и E^2 независимо выбраны из H , $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$ в которых X является галогеном или E^1 и E^2 вместе составляют $(=O)$. Остальные заместители – как определены ранее.

Типичные варианты реализации в которых конъюгаты Лиганд-Лекарство, Лекарство-Линкеры, Линкеры или конъюгаты Лиганд-Линкер представлены Формулой III (или формулами IIIa, IIIb, IIIc, или IIId, в зависимости от ситуации) или их фармацевтически приемлемыми солями, включая те, в которых:

- (i) E^1 и E^2 независимо выбраны из водорода, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$, и $-X$ в которых X является галогеном или E^1 и E^2 вместе составляют $(=O)$;
- (ii) m равен нулю и n равен нулю, единице, двум или трем;
- (iii) x равен 1;
- (iv) x равен 4;
- (v) x равен нулю, и n равен нулю, единице, двум или трем;
- (vi) m равен нулю, n равен нулю, и x равен 1;
- (vii) d равен 1 и g равен от 1 до 5;
- (viii) d равен 1 и g равен от 2 до 5;
- (ix) n , d , и g равны нулю;
- (x) m , n , d , и g равны нулю;
- (xi) $RS - C(=O)-$;
- (xii) E^1 и E^2 вместе образуют $(=O)$;
- (xiii) B представляет собой



, или $-N(R^3)(R^4)$, где R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 и R^8

независимо выбраны из H или C_{1-6} алкила и e равен 0 до 4;

(xiv) В - $N(R^3)(R^4)$, где R^3 и R^4 независимо выбраны из H или C_{1-6} алкила;

(xv) В - как в (xiii) или (xiv) и R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 и R^8 независимо выбраны из H или C_{1-3} алкила;

(xvi) В - как в (xiii) или (xiv) и R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 и R^8 независимо выбраны из H или метила;

(xvii) В - как в (xiii) или (xiv) или (xvi) и R^3 и R^4 являются водородом;

(xviii) В - как в (xiii) или (xiv) или (xvi) и по меньшей мере один из R^3 и R^4 являются водородом;

(xix) В - как в (xiii) или (xiv) или (xvi) и по меньшей мере один из R^3 и R^4 не являются водородом;

(xx) R^1 , R^9 , и R^{10} независимо выбраны из H или метила;

(xxi) R^1 , R^9 , и R^{10} являются водородом;

(xxii) R^1 , R^9 , и R^{10} независимо выбраны из H или метила;

(xxiii) Отщепляемая группа присутствует;

(xxiv) Отщепляемая группа присутствует и имеет формулу

$-(AA-AA)_{1-6}^-$; где AA в каждом случае независимо выбран из аминокислоты;

(xxv) Отщепляемая группа присутствует и сконъюгирована непосредственно с Лекарственной группой;

(xxvi) Отщепляемая группа присутствует и сконъюгирована непосредственно с Лекарственной группой через расщепляемую пептидную, дисульфидную или гидразоновую связь;

(xxvii) Отщепляемая группа присутствует, и Разделитель и Расширитель отсутствуют;

(xxviii) Лекарство является ауристатином;

(xxix) M^1 представляет собой гидролизированный или негидролизированный сукцинимид;

(xxx) p составляет около 4;

(xxxi) p составляет около 8;

(xxxii) период полугидролиза тиозамещенного сукцинимиды Самостабилизирующей Линкерной группы составляет от около 10 минут до около 2,5 часов при pH 7,4 и 22°C;

(xxxiii) период полугидролиза тиозамещенного сукцинимиды Самостабилизирующей Линкерной группы составляет от около 10 минут до около 1 часа при pH 7,4 и 22°C;

(xxxiv) период полугидролиза тиозамещенного сукцинимиды Самостабилизирующей Линкерной группы составляет от около 10 минут до около 30 минут при pH 7,4 и 22°C;

(xxxv) Лигандная группа является антителом;

(xxxvi) Лигандная группа представляет собой антитело и присоединена к Линкерной группе через цистеиновый остаток межцепочечного дисульфида;

(xxxvii) Лигандная группа является моноклональным антителом;

и любые сочетания и подсочетания из (i)-(xxxvii), при условии, что эти сочетания и подсочетания не противоречат друг другу (например, xxx и xxxi противоречат, потому что p не может быть одновременно около 4 и около 8). Например, в отдельных вариантах реализации m равен нулю, и n равен нулю, одному, двум или трем. В других отдельных вариантах реализации m равен нулю, n равен нулю, и x равен одному. В любом из таких отдельных вариантов реализации d может быть единицей и g может быть от 1 до 5 или d может быть единицей и g может быть от 2 до 5. В любом из этих вариантов реализации можно применять один или более из (i), (iii) или (xi)-(xxxvi).

В каждом из отдельных вариантов реализации в которых конъюгаты Лиганд-Лекарство, Лекарство-Линкеры, Линкеры или конъюгаты Лиганд-Линкер представлены

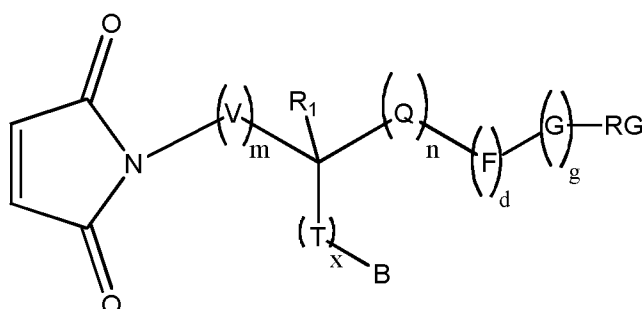
Формулой III (или формулами IIIa, IIIb, IIIc, или IIId, в зависимости от ситуации) или их фармацевтически приемлемыми солями, необязательная вторичная линкерная область может быть представлена следующей формулой:



или 1;

-W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; и -Y- - необязательная Разделительная группа, и индекс y' равен 0 или 1.

Также включены отдельные варианты реализации в которых линкер имеет формулу:



или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль, где V, T, B, R^1 , Q, F, G, m, x, n, d, и g – как определено для формулы III и RG - реакционноспособная группа, содержащая реакционноспособный участок, RS, для конъюгации с Лекарственной группой D, когда необязательная вторичная линкерная область отсутствует или с компонентом вторичной линкерной области, где вторичная линкерная область вторичный линкер имеет следующую формулу:

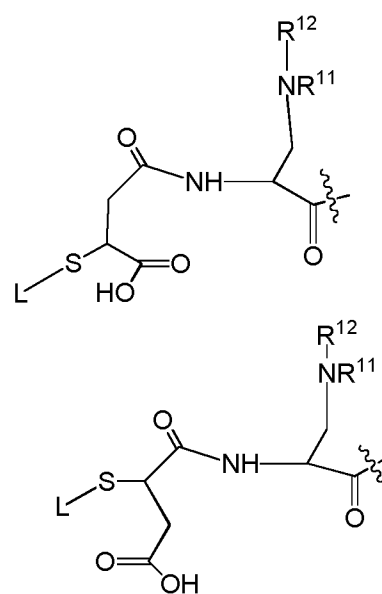
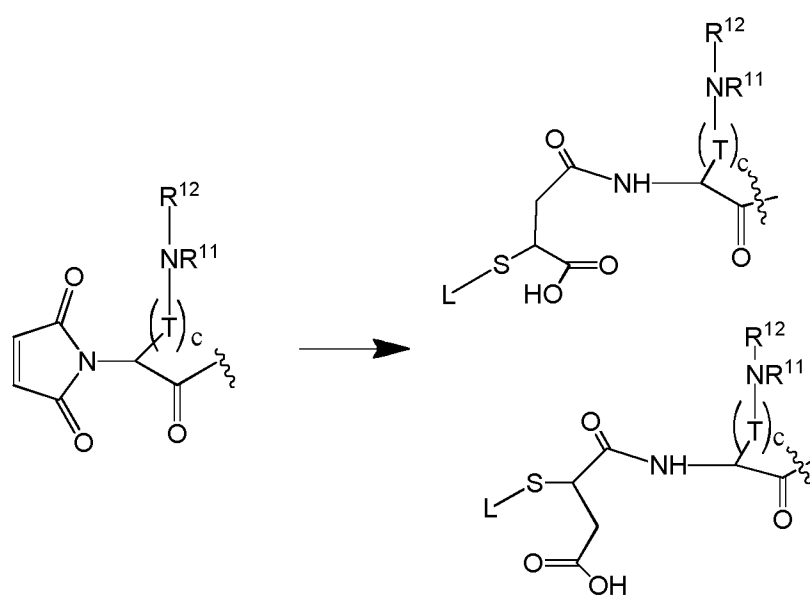
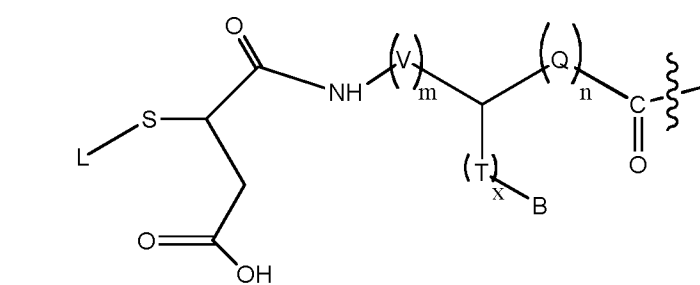
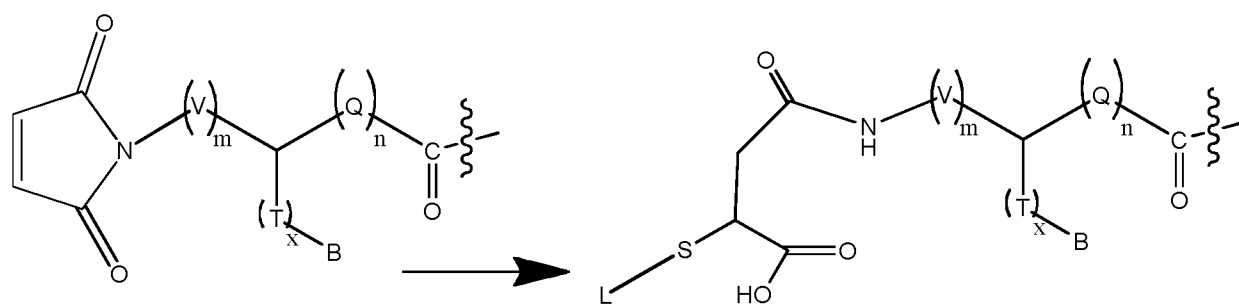


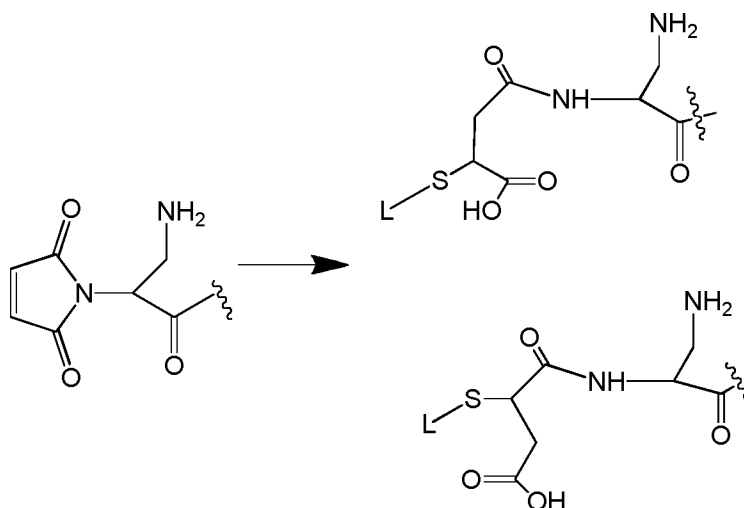
или 1;

-W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; и -Y- - необязательная Разделительная группа, и индекс y' равен 0 или 1.

Дополнительные варианты осуществления изобретения

Типичными самостабилизирующимися линкерными областями перед конъюгацией с Лигандом и последующей конъюгации и гидролиза тиозамещенного сукцинимидом, которые образуются в результате конъюгации, являются следующие:



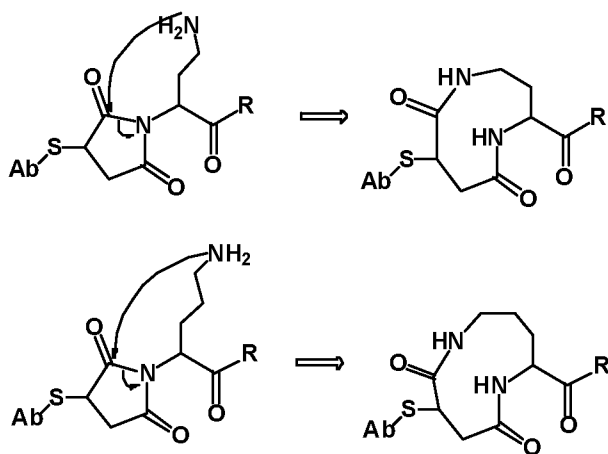


или их фармацевтически приемлемые соли, где V, Q, T, m, n, x, и B, определены выше для Формулы III или в любом другом отдельном варианте осуществления, с равен от 1 до 4, и R¹¹ и R¹², в каждом случае, независимо выбран из H или C₁-C₆ алкила. В типичном варианте реализации с равен 1 или 4. “S” гидролизованного тиосукцинимиды изображает атом серы Лиганда (например, антитело). Волнистая линия показывает присоединение ко вторичной линкерной области или к Лекарственной группе. В типичном варианте реализации волнистая линия показывает присоединение к следующей вторичной линкерной области

— ξ —A_{a'}—W_{w'}—Y_{y'}— ξ — где -A- - необязательный Расширитель, индекс a' равен 0 или 1;

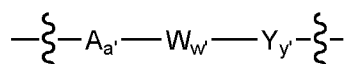
-W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; и -Y- - необязательная Разделительная группа, и индекс y' равен 0 или 1. Следует понимать, что более чем один (например, от 1 до 20) лекарство-линкер может быть присоединен к каждому Лиганду.

В некоторых вариантах настоящего изобретения самостабилизирующаяся линкерная область может подвергаться макроциклизации, чтобы образовать дилактам, как указано ниже, где R изображает остаток конъюгата:



Вторичная Линкерная Область

Необязательный вторичный линкер может содержать ряд связывающих групп. В каждом из вариантов реализации предложенных здесь, включая конкретно перечисленные варианты реализации L^O может присутствовать и имеет формулу:



где

-A- - необязательный Расширитель, индекс a' равен 0 или 1;

-W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; и

-Y- - необязательная Разделительная группа, и индекс y' равен 0 или 1;

Необязательная вторичная линкерная область может быть высвобождаемой линкерной областью, L^R . В этих вариантах реализации w равен 1. В некоторых других вариантах необязательная вторичная линкерная область представляет собой невысвобождаемую линкерную область. В этих вариантах реализации w равен 0 и высвобождение лекарства идет через общий путь разложения белка (*m.e.*, неотщепляемый путь).

Лигандная Группа

В некоторых вариантах реализации изобретения присутствует Лигандная группа. Лигандная группа (L-) является нацеливающим средством, которое специфично связывается с целевой частью молекулы. Лиганд может специфично связываться с частью клетки (клеточно-связывающее средство) или с другими целевыми интересующими молекулами. В некоторых вариантах Лигандная группа действует, чтобы доставить Лекарственную группу к конкретной целевой клеточной популяции, с которой Лигандная группа взаимодействует. Лиганды включают в себя, но не ограничиваются этим, белки, полипептиды и пептиды. Подходящие Лигандные группы включают в себя, например, антитела, например, полноразмерные антитела и их антиген-связывающие фрагменты,

интерфероны, лимфокины, гормоны, факторы роста и колониестимулирующие факторы, витамины, молекулы, транспортирующие питательные вещества (например, но не ограничиваясь этим, трансферрин), или любые другие клеточно-связывающие молекулы или соединения. В некоторых вариантах лиганд является белок-нацеливающим средством, но не антителом. В некоторых вариантах предлагается Лиганд-Функциональное средство, в котором D' - Метка или Стабилизатор и Лигандная группа представляет собой белок (например, белок, но не антитело).

В некоторых вариантах Лигандная группа образует связь с малеимидом Самостабилизирующей Основной группы через сульфгидрильную группу Лиганда, чтобы образовать тиозамещенный сукцинимид. Сульфгидрильная группа может присутствовать на Лиганде в естественном состоянии Лиганда, например, быть природным остатком, или может быть введена в Лиганд путем химической модификации.

Для биоконъюгатов наблюдали, что сайт конъюгации лекарства может влиять на множество параметров, включая простоту конъюгации, стабильность лекарство-линкера, действия на биофизические свойства получающихся в результате биоконъюгатов, и на цитотоксичность *in vitro*. В отношении стабильности лекарство-линкера, сайт конъюгации лекарство-линкера с лигандом может влиять на способность конъюгированного лекарства-связки подвергаться реакции элиминирования и для лекарственного линкера, который должен быть перенесен от лиганда биоконъюгата к альтернативному реакционноспособному тиолу, присутствующему в среде биоконъюгата, такому, как, например, реакционноспособный тиол в альбумине, свободном цистеине, или глутатионе в плазме. Использование Самостабилизирующих Линкеров настоящего изобретения имеет особые преимущества, когда конъюгирование с тиолом остатков идет в сайтах, которые восприимчивы к реакции элиминирования и последовательного переноса лекарства-линкера, если используются несамостабилизирующиеся алкильные малеимиды (например, малеимидо-капроильный лекарственный линкер). Такие сайты включают в себя, например, межцепочечные дисульфиды, а также отдельные цистеиновые сконструированные сайты. Использование Самостабилизирующих Линкеров настоящего изобретения предполагает стабильное связывание и способность присоединять несколько лекарств в каждой Лигандной группе.

В одном варианте Лигандная группа содержит один или более остатков лизина которые могут быть химически модифицированы, чтобы ввести одну или более сульфгидрильных групп. Реагенты, которые могут быть использованы, чтобы модифицировать лизины, включают в себя, но не ограничиваются этим, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолана гидрохлорид (реагент Трота).

В другом варианте реализации Лигандная группа может содержать одну или более углеводных групп, которые могут быть химически модифицированы, чтобы содержать одну или более сульфгидрильных групп.

В другом варианте реализации Лиганд представляет собой антитело, и сульфгидрильная группа образуется восстановлением межцепочечного дисульфида. Таким образом, в некоторых вариантах реализации Линкерная группа сконъюгирована с цистеиновым остатком восстановленных межцепочечных дисульфидов.

В другом варианте реализации сульфгидрильная группа химически введена в антитело, например, путем введения цистеинового остатка. Таким образом, в некоторых вариантах реализации Линкерная группа сконъюгирована с введенным цистеиновым остатком.

Полезные неиммунореактивные белковые, полипептидные, или пептидные Лиганды включают в себя, но не ограничиваются этим, трансферрин, эпидермальные факторы роста ("EGF"), бомбезин, гастрин, гастрин-высвобождающий пептид, тромбоцитный фактор роста, IL-2, IL-6, трансформирующие факторы роста ("TGF"), такие, как TGF- α и TGF- β , фактор роста вируса коровьей оспы ("VGF"), инсулин и инсулиноподобные факторы роста I и II, соматостатин, лектины и апопротеин из липопротеина низкой плотности.

Особенно предпочтительными лигандами являются антитела. Полезные поликлональные антитела являются гетерогенными популяциями молекул антител, происходящих из сыворотки иммунизированных животных. Полезные моноклональные антитела являются однородными популяциями антител к специфическим антигенным детерминантам (*например*, антигену раковой клетки, вирусному антигену, микробному антигену, белку, пептиду, углеводу, химикату, нуклеиновой кислоте, или их фрагментам). Моноклональное антитело (mAb) к соответствующему антигену может быть изготовлено с использованием любой методики, известной в данной области, которая обеспечивает производство молекул антител путем непрерывного поддержания клеточных линий в культуре.

Пригодные моноклональные антитела включают в себя, но не ограничиваются этим, человеческие моноклональные антитела, гуманизированные моноклональные антитела, или химерные моноклональные антитела человека-мыши (или других видов). Антитела включают в себя полноразмерные антитела и их антиген-связывающие фрагменты. Человеческие моноклональные антитела могут быть изготовлены по любой из многочисленных методик, известных в данной области (*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 быть функционально активным фрагментом, производным или аналогом антитела, которое иммуноспецифично связывается с целевыми клетками (*например*, антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами) или другими антителами, связанными с клетками опухоли или матриксом. В этом отношении “функционально активный” означает, что фрагмент, производное или аналог в состоянии индуцировать анти-анти-идиотипные антитела, которые распознают тот же самый антиген, что и антитело, от которого произошли фрагмент, производное или аналог. Конкретно, в типичном варианте реализации антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина может быть увеличена путем делеции рамочной и CDR-последовательностей, которые являются С-терминальными по отношению к CDR-последовательности (участку, определяющему комплементарность), которая специфично распознает антиген. Чтобы определить, какие CDR-последовательности связывают антиген, синтетические пептиды, содержащие CDR-последовательности, могут быть использованы в измерениях связывания с антигеном с помощью любого способа измерения связывания, известного в данной области (*например*, BIAcore анализ) (*см.*, *например*, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969).

Другие полезные антитела включают в себя фрагменты антител, такие, как, но не ограничиваясь этим, F(ab')₂ фрагменты, Fab фрагменты, Fvs, одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетратела, scFv, scFv-FV, или любые другие молекулы с той же специфичностью, что и антитело.

Кроме того, рекомбинантные антитела, такие, как химерные или гуманизированные моноклональные антитела, содержащие участки как человеческого, так и нечеловеческого происхождения, которые могут быть изготовлены, используя стандартные методики рекомбинантной ДНК, являются полезными антителами. Химерное антитело – молекула, в которой различные участки происходят от различных видов животных, такие, как, например, имеющие моноклональный вариабельный регион от мыши и константные участки иммуноглобулина человека. (*См.*, *например*, патент США № 4 816 567; и патент США № 4 816 397, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.) Гуманизированные антитела – молекулы антител видов, отличных от человека, имеющие один или более участков, определяющих комплементарность (CDR) от вида, не являющегося человеком и каркасный участок от молекулы иммуноглобулина человека. (*См.*, *например*, патент США № 5,585,089, который полностью включен в настоящий

документ посредством ссылки.) Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть произведены по методикам рекомбинантной ДНК, известным в данной области, например, используя способы, описанные в Международной публикации № WO 87/02671; Европейской публикации патента № 0 184 187; Европейской публикации патента № 0 171 496; Европейской публикации патента № 0 173 494; Международной публикации № WO 86/01533; патенте США № 4 816 567; Европейской публикации патента № 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; и 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 № 5 225 539; 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 полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Полностью человеческие антитела особенно желательны и могут быть получены, используя трансгенных мышей, которые не в состоянии экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, но которые могут экспрессировать гены тяжелой и легкой цепей [иммуноглобулина] человека.

Антитела включают в себя производные и аналоги, которые каким-либо образом модифицированы, *т.е.* ковалентным присоединением молекулы любого типа, настолько такое ковалентное присоединение позволяет антителу сохранять свою антиген-связывающую иммуноспецифичность. Например, без ограничения вышесказанное, производные и аналоги антител включают в себя те, которые могут быть далее модифицированы, *например*, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидацией, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим отщеплением, привязывание к группе клеточного антитела или другому белку, и т.д. Любые из многочисленных химических модификаций могут быть воплощены по известным методикам, включая, но не ограничиваясь этим, специфическое химическое отщепление, ацетилирование, формилирование, метаболические синтез в присутствии туникамицина, и т.д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или более не природных аминокислот.

Антитела могут иметь модификации (*например*, замены, делеции или дополнения) в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют в рецепторами Fc. В частности, антитела могут содержать модификации в аминокислотных остатках, идентифицированных как участвующие во взаимодействии между анти-Fc доменом и

рецептором FcRn (см., *например*, Международную публикацию № WO 97/34631, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Антитела, иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, могут быть получены коммерчески или произведены любым способом, известным специалистам в данной области, таким, как, *например*, химический синтез или методики рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, может быть получена, *например*, из базы данных GenBank или базы данных, подобной ей, публикаций в литературе, или путем рутинного клонирования и секвенирования.

В особом варианте реализации могут быть использованы известные антитела для лечения рака. Антитела, иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, могут быть получены коммерчески или произведены любым способом, известным специалистам в данной области, таким, как, *например*, методики рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, может быть получена, *например*, из базы данных GenBank или базы данных, подобной ей, публикаций в литературе или рутинным клонированием и секвенированием.

В другом особом варианте реализации антитела для лечения аутоиммунного заболевания использованы согласно композициям и способам по изобретению. Антитела, иммуноспецифичные к антигену клетки, которая ответственна за продуцирование аутоиммунных антител, могут быть получены от любой организации (*например*, университетского ученого или компании) или произведены любым способом, известным специалистам в данной области, таким, как, *например*, химический синтез или методики рекомбинантной экспрессии. В другом варианте реализации полезные антитела, иммуноспецифичные для лечения аутоиммунных заболеваний, включают в себя, но не ограничиваются этим, антиядерное антитело; антитело к двухцепочечной ДНК; антитело к одноцепочечной ДНК, анти-кардиолипиновое антитело IgM, IgG; антифосфолипидное антитело IgM, IgG; антитело к антигену гладких мышц; антимитохондриальное антитело; тиреоидное антитело; микросомальное антитело; тироглобулиновое антитело; антитело к прогрессирующей системной склеродермии; анти-Jo антитело; антитело к U₁-рибонуклеопротеину; анти-La/SSB антитело; анти-SSA; анти-SSB антитело; антитело против перитальных клеток; анти-гистонное антитело; антитело к рибонуклеопротеину; антинейтрофильное антитело классов C и P; анти-центромерное антитело; анти-фибриллириновое антитело и антитело к антигену базальной мембраны клубочков.

В некоторых вариантах реализации полезные антитела могут связываться с

рецептором или рецепторным комплексом, экспрессируемом на активированном лимфоците. Рецептор или рецепторный комплекс может содержать член суперсемейства генов иммуноглобулина, член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, интегрин, рецептор цитокина, рецептор хемокина, главный белок гистосовместимости, лектин, или комплемент-контролирующий белок. Неограничивающими примерами подходящих членов суперсемейства иммуноглобулинов являются CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD28, CD30, CD70, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, и ICOS. Неограничивающими примерами подходящих членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли являются CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, остеопотегерин, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, и APO-3. Неограничивающими примерами подходящих интегринов являются CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103, и CD104. Неограничивающими примерами подходящих лектинов являются лектины С-типа, S-типа, и I-типа.

Лекарственная группа, D

Лекарственная группа (D) может быть любым цитотоксическим, цитостатическим или иммуносупрессорным лекарством, также называемом здесь как цитотоксическое, цитостатическое или иммуносупрессорное средство. Лекарственная группа содержит атом, который может образовать связь с Линкерной Группой. В некоторых вариантах реализации Лекарственная группа D содержит атом азота, который может образовать связь с Линкерной Группой. В других вариантах реализации Лекарственная группа D содержит карбоновую кислоту, которая может образовать связь с Линкерной группой. В других вариантах реализации Лекарственная группа D содержит сульфгидрильную группу, которая может образовать связь с Линкерной группой. В других вариантах реализации Лекарственная группа D содержит гидроксильную группу или кетон, который может образовать связь с Линкерной группой.

Полезные классы цитотоксических или иммуносупрессорных средств включают в себя, например, антитубулиновые вещества, ауристатинны, ДНК-связывающие белки, взаимодействующие с малой бороздкой, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие вещества (*например*, комплексы платины такие, как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и три-ядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиотерапевтические сенсibilизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, подготовительные соединения, пуриновые антиметаболиты, пуромицины, радиационные сенсibilизаторы, стероиды, таксаны,

ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка или нечто подобное. Конкретные примеры полезных классов цитотоксических средств включают в себя, например, ДНК-связывающие белки, взаимодействующие с малой бороздкой, алкилирующие ДНК вещества и ингибиторы тубулина. Типичные цитотоксические агенты включают в себя, например, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзины и майтанзиноиды (например, DM1 и DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4] бензодиазепины (PBDs), индолинобензодиазепины, и оксалидинобензодиазепины) и алкалоиды барвинка. Отдельные бензодиазепины, содержащие лекарства, описаны в международных патентах WO 2010/091150, WO 2012/112708, WO 2007/085930 и WO 2011/023883.

Индивидуальные цитотоксические или иммуносупрессорные средства включают в себя, например, андроген, антрамицин (AMC), аспарагиназу, 5-азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бисульфат, бутионина сульфоксимин, калехемицин, камптотецин, карбоплатин, кармустин (BSNU), CC-1065, хлорамбуцил, цисплатин, колхицин, циклофосфамид, цитарабин, цитидина арабинозид, цитохалазин В, дакарбазин, дактиномицин (ранее - актиномицин), даунорубицин, декарбизин, доцетаксел, доксорубицин, этопозид, эстроген, 5-фтордезоксифуридин, 5-фторурацил, гемцитабин, грамицидин D, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ломустин (CCNU), майтанзин, мехлорэтамин, мелфалан, 6-меркаптопурин, метотрексат, митрамицин, митомицин С, митоксантрон, нитроимидазол, паклитаксел, палитоксин, пликамицин, прокарбизин, ризоксин, трептозотоцин, тенопозид, 6-тиогуанин, тиотетразилилпентамин, топотекан, винбластин, винкристин, винорелбин, VP-16 и VM-26.

В некоторых типичных вариантах реализации подходящие цитотоксические средства включают в себя, например, ДНК-связывающие белки, взаимодействующие с малой бороздкой (например, энедины и лекситропсины, циклопропабензиндольное соединение; см. также патент США № 6 130 237), дуокармицины (см. Публикацию США № 20060024317), таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), пурамицины, алкалоиды барвинка, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолино-доксорубицин, ризоксин, цианоморфолино-доксорубицин, эхиномицин, комбретастин, нетропсин, эпотилон А и В, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, дискодермолид, элеутеробин, и митоксантрон.

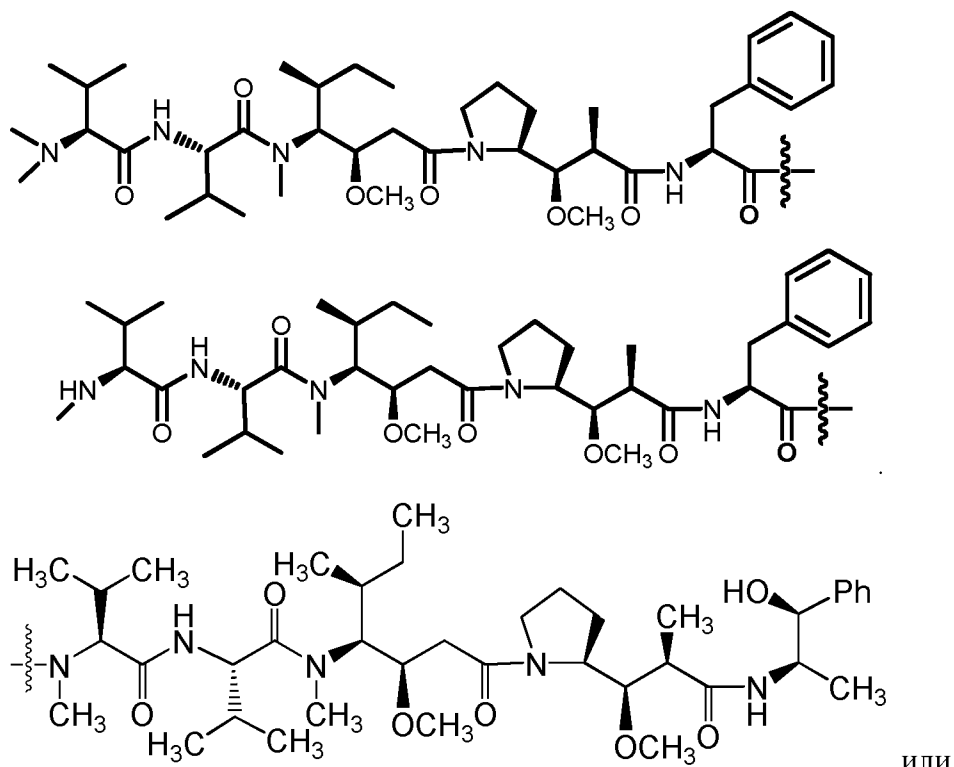
В некоторых вариантах реализации Лекарственная группа представляет собой антитубулиновое вещество. Примеры антитубулиновых веществ включают в себя, но не ограничиваются этим, таксаны (например, Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел)),

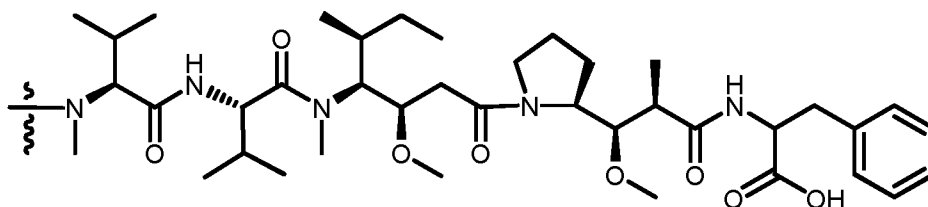
Т67 (Туларик) и алкалоиды барвинка (*например*, винкрестин, винбластин, виндезин и винорелбин). Другие анти tubулиновые вещества включают в себя, например, производные баккатина, аналоги таксана (*например*, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин.

В некоторых вариантах реализации цитотоксическое средство представляет собой майтанзин или майтанзиноид, другую группу анти tubулиновых веществ. (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:127-131 и патент США № 8 163 888).

В некоторых вариантах реализации Лекарственная группа представляет собой ауристатины. Ауристатины включают в себя, но не ограничиваются этим, АЕ, АРР, АЕВ, АЕВВ, ММАЕ, и ММАЕ. Синтез и структура ауристатинов описаны в Публикациях заявок на патенты США №№ 2003-0083263, 2005-0238649 2005-0009751, 2009-0111756, и 2011-0020343; Международной публикации патента № WO 04/010957, Международной публикации патента № WO 02/088172, и патентах США №№ 7 659 241 и 8 343 928; каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте и для любых целей. Типичные ауристатины настоящего изобретения связывают тубулин и оказывают цитотоксический или цитостатический эффект на желаемую клеточную линию.

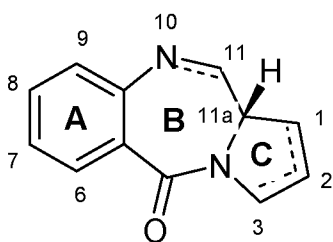
Типичные ауристатиновые Лекарственные группы имеют следующую формулу или представляют собой их фармацевтически приемлемую соль, где волнистая линия показывает место присоединения к Линкерной группе:





В некоторых вариантах реализации Лекарство представляет собой бензодиазепин (включая бензодиазепинсодержащие лекарства, *например*, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинобензодиазепины и оксалидинобензодиазепины).

Бензодиазепины имеют общую структуру:



но могут различаться по количеству, типу и положению заместителей, как в их ароматических А кольцах, так и пирроло С кольцах, и по степени насыщенности С кольца. В В-кольце имеется или имин ($N=C$), карбиноламин ($NH-CH(OH)$), или метиловый простой эфир карбиноламина ($NH-CH(OMe)$) в положении N10-C11, который является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все из известных продуктов природного происхождения имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, которое придает им правостороннее скручивание, если смотреть от С кольца в направлении А кольца. Это придает им подходящую трехмерную форму для спирального соответствия с малой бороздкой ДНК В-формы, приводя к точной подгонке в сайте связывания. Способность бензодиазепинов образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им интерферировать с процессингом ДНК, поэтому их используют как противоопухолевые средства. Биологическая активность этих молекул может быть увеличена, например, присоединением бензодиазепиновых групп вместе через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы через гибкий алкиленовый линкер. Считается, что димеры бензодиазепина образуют избирательные для последовательностей повреждения ДНК, такие, как палиндромные 5'-Pu-GATC-Py-3' межнитевые сшивки, которые считаются в основном ответственными за их биологическую активность.

Имеется множество различных способов химического анализа, которые могут быть использованы для определения, действительно ли Конъюгат Лиганд-Лекарство оказывает цитостатическое или цитотоксическое воздействие на клеточную линию. В одном примере для определения, действительно ли Конъюгат Лиганд-Лекарство оказывает

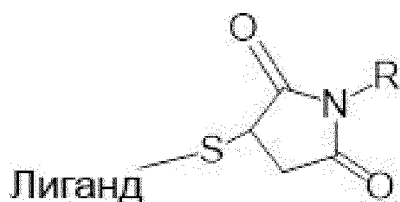
цитостатическое или цитотоксическое воздействие на клеточную линию, используют способ с включением тимидина. Например, клетки при плотности 5,000 клеток на лунку 96-луночного планшета культивируют в течение 72-часового периода и подвергают действию 0,5 μCi ^3H - тимидина в течение последних 8 часов 72-часового периода, и инкорпорацию ^3H -тимидина в клетки культуры измеряют в присутствии и отсутствии Конъюгата Лиганд-Лекарство. Конъюгат Лиганд-Лекарство имеет цитостатическое или цитотоксическое воздействие на клеточную линию, если количество клеток в культуре с включением ^3H -тимидина уменьшено по сравнению с количеством клеток той же клеточной линии в тех же условиях культивирования, но не контактировавших с Конъюгатом Лиганд-Лекарство.

В другом примере, для определения, действительно ли Конъюгат Лиганд-Лекарство оказывает цитостатическое или цитотоксическое воздействие на клеточную линию, жизнеспособность клеток измеряли путем определения в клетках захвата красителя, такого, как нейтральный красный, трипановый синий или ALAMARTTM синий (см., например, Page *et al.*, 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476). В таком анализе клетки инкубировали в среде, содержащей краситель, клетки промывали, и оставшийся краситель, отражающий захват клетками красителя, измеряли спектрофотометрически. Белок-связывающий краситель сульфородамин В также может быть использован, чтобы измерить цитотоксичность (Skehan *et al.*, 1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12). Предпочтительные конъюгаты Лиганд- Лекарство включают в себя те, у которых значение полулетальной концентрации (IC_{50}), (определяемое как концентрация моноклональных антител, которая дает 50% гибели клеток) составляет менее чем 1000 нг/мл, предпочтительно менее чем 500 нг/мл, более предпочтительно менее чем 100 нг/мл, даже наиболее предпочтительно менее чем 50 или даже менее чем 10 нг/мл на клеточную линию.

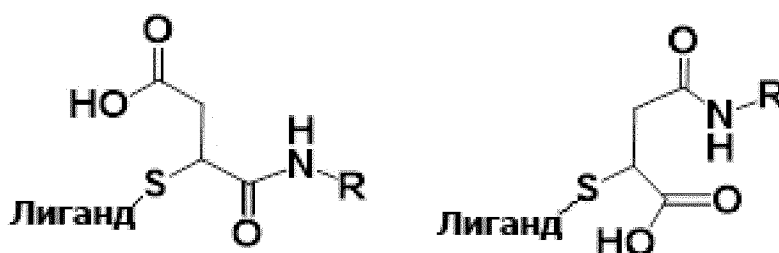
Общие методики связывания лекарства с линкерами известны в данной области. См., например, патенты США №№ 8 163 888, 7 659 241, 7 498 298, Публикации США № US20110256157 и Международные заявки №№ WO2011023883, и WO2005112919.

M¹ – сукцинимид

Негидролизованный сукцинимид (также называемый здесь как сукцинимидное кольцо), сконъюгированный с Лигандной группой простой тиоэфирной связью, представлен ниже, где R изображает остаток Линкерной группы, необязательно сконъюгированный с Лекарственной группой, Меткой или Стабилизатором:



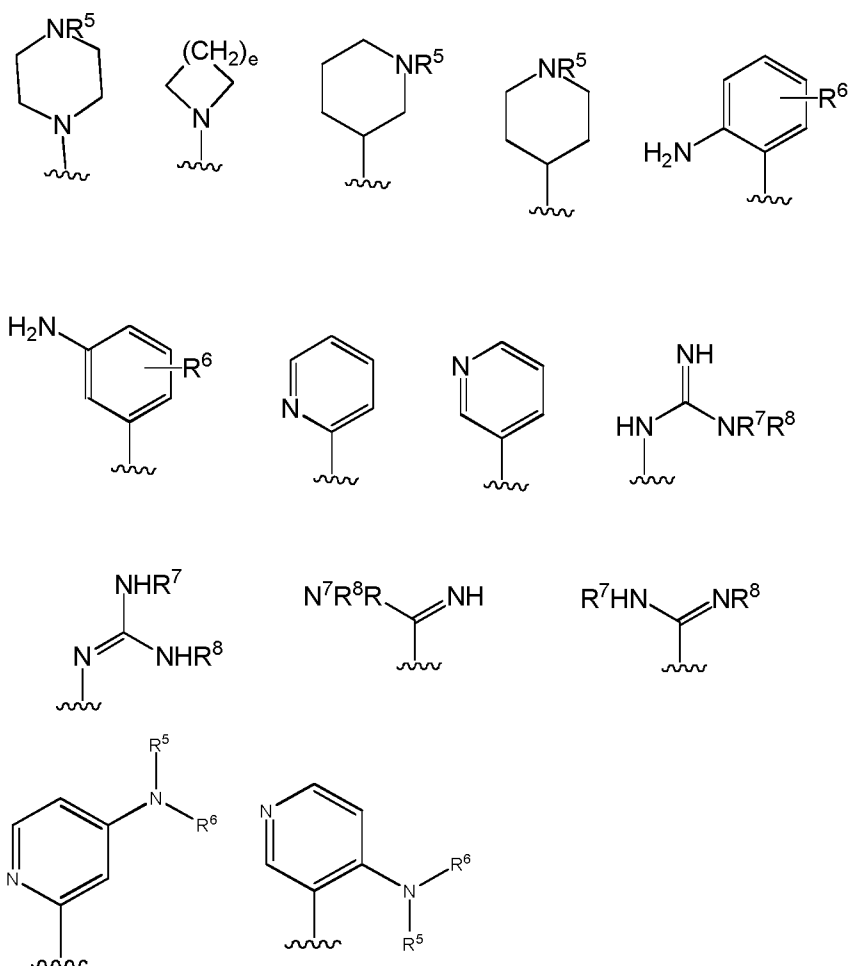
Гидролизированный сукцинимид (также называемый здесь как гидролизованное сукцинимидное кольцо), сконъюгированный с Лигандной группой простой тиоэфирной связью, может быть представлен как один из двух своих пространственных изомеров как на рисунке ниже, где R изображает остаток Линкерной группы, необязательно сконъюгированный с Лекарственной группой, Меткой или Стабилизатором:



Будет понятно для структур негидролизированных сукцинимидов и гидролизированных сукцинимидов, что здесь может быть от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12, 1 до 10 или от 1 до 8 самостабилизирующихся линкеров, сконъюгированных с каждым Лигандом. В некоторых вариантах имеется от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12, 1 до 10 или от 1 до 8 лекарство-линкеров, сконъюгированных с каждым Лигандом. Кроме того, для конъюгатов, описанных в этом документе, в которых Лиганд не присоединяется, сукцинимид находится в ненасыщенной форме как малеимид (способный реагировать с тиолом или Лигандом).

Основная группа

В Формуле I, а также в других формулах, содержащих самостабилизирующийся линкер (L^{SS}), Основная группа (BU) может быть, по существу, любым основанием, способным облегчать атаку гидроксид-иона (или воды), чтобы гидролизовать находящуюся поблизости сукцинимидную группу. Таким образом, BU изображает любое “основание”, но обычно является группой, содержащей привязанный амин, или азотсодержащим гетероциклом; где амин или азотсодержащий гетероцикл действуют как основание Основной группы. Типичные представители аминов включают в себя – $N(R^3)(R^4)$, где R^3 и R^4 независимо выбраны из H или C_{1-6} алкила, предпочтительно H или метила,



где R^5 , R^6 , R^7 и R^8 в каждом случае независимо выбраны из водорода или C_{1-6} алкила, предпочтительно Н или метила, и e равен 0-4. В формулах выше волнистая линия показывает место присоединения к привязанной группе (обычно алкиленовому линкеру – $(C(R^9)(R^{10}))_x$ – где индекс x - целое число от 0 до 6 (или 1 до 6) при условии, что если x равен 0, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама, и R^9 и R^{10} независимо выбраны из Н или C_{1-3} алкила. В некоторых вариантах алкиленовый линкер – $-(CH_2)_x-$, где индекс x - целое число от 0 до 6 (или 1 до 6) при условии, что если x равен 0, имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного) или дилактама. Индекс x предпочтительно равен от 0 до 4, от 1 до 4, или от 1 до 3, или от 2 до 3, или от 2 до 4, но может также быть равен 0, 1, 2, 3 или 4. Таким образом, Основная группа, будет в некоторых вариантах реализации выбрана из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0 до 4, от 1 до 4, или от 1 до 3, или от 2 до 3, или от 2 до 4, но может также быть равен 0, 1, 2, 3 или 4, и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы

образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу. В предпочтительных вариантах основание Основной группы будет азотистым основанием.

Усилители Гидролиза (НЕ) и электроноакцепторные группы

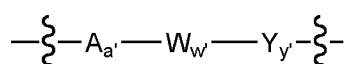
Усилители гидролиза (НЕ) Формулы I, а также в других формулах, содержащих самостабилизирующийся линкер (L^{SS}), могут быть в основном любой электроноакцепторной группой, способной облегчить гидролиз находящейся поблизости сукцинимидной группы. Гидролиз дополнительно облегчается Основной группой (BU), помогающей гидроксид-иону (или воде) атаковать, чтобы гидролизовать находящуюся поблизости сукцинимидную группу; или чтобы привести находящуюся поблизости сукцинимидную группу в состояние большей восприимчивости к гидролизу. Таким образом, НЕ могут включать в себя функциональную группу, которая удаляет электроны из реакционного центра. Типичные электроноакцепторные группы включают в себя, но не ограничиваются этим, $-C(=O)$, $(=O)$, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$, $-X$, $-COOR$, $-CONR_2$, $-COR$, $-COX$, $-SO_2R$, $-SO_2OR$, $-SO_2NHR$, $-SO_2NR_2$, $-PO_3R_2$, $-P(O)(CH_3)NHR$, NO , $-NR_3^+$, $-CR=CR_2$, и $-C\equiv CR$ где X - F, Br, Cl, или I, и R в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C_{1-6} алкила. Типичные электроноакцепторные группы могут также включать в себя арильные группы (например, фенил) и некоторые гетероарильные группы (например, пиридин). Термин “электроноакцепторные группы” включает в себя арилы или гетероарилы, дополнительно замещенные электроноакцепторными группами.

В некоторых вариантах реализации НЕ содержит карбонильную, сульфонильную или фосфорильную группу. В некоторых вариантах реализации усилитель гидролиза (НЕ) - $-CH_2C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, или $-CH_2C(O)NH-$.

В некоторых вариантах реализации в которых НЕ непосредственно связан с вторичной линкерной областью или Лекарственной группой или Стабилизатором или Меткой, НЕ будет содержать реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группе. В некоторых вариантах электроноакцепторная группа сама будет действовать и как электроноакцепторная группа, и как реакционноспособный участок для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или Лекарственной группе (например, $-C(=O)-$).

Необязательная вторичная линкерная область (L^0)

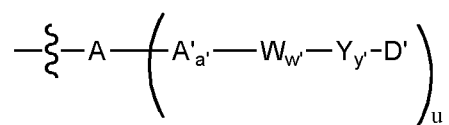
Как отмечено выше, необязательная вторичная линкерная область может быть представлена формулой:



где -A- - необязательный Расширитель, индекс a' равен 0 или 1; -W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; и -Y- - необязательная Разделительная группа, и индекс y' равен 0 или 1. Волнистая линия, прилегающая к необязательному Расширителю, показывает место присоединения к самостабилизирующей линкерной области и волнистая линия прилегающая к необязательному Разделителю, показывает место присоединения к Лекарственной группе.

Общие методики присоединения Лекарственной группы, Метки, или Стабилизатора к Лигандной группе известны в данной области техники, и линкеры, известные в данной области, могут быть адаптированы для использования с самостабилизирующей линкерной областью или модифицированы, чтобы включить основной компонент и/или электроноакцепторную группу, используя сведения, приведенные в данном описании. Например, ауристатиновые и майтанзиновые ADC в настоящее время находятся в клинической разработке для лечения рака. Монометил ауристатин E, сконъюгированный с антителом через отщепляемый протеазой пептидный линкер, монометил ауристатин F, сконъюгированный с антителом непосредственно через малеимидокапроновую кислоту, DM1, сконъюгированный через дисульфид или непосредственно через гетеробифункциональный SMCC линкер, и DM4, сконъюгированный через дисульфидный линкер. Эти линкерные системы могут быть адаптированы для использования со самостабилизирующей линкерной областью или модифицированы, чтобы включить основной компонент и/или электроноакцепторную группу, используя сведения, приведенные в данном описании, и предоставить высвобождение лекарства системой с отщеплением или без отщепления в зависимости от используемой линкерной системы. Дисульфидная, простая тиоэфирная, пептидная, гидразиновая, сложноэфирная или карбаматная связи – все это примеры связей, которые могут быть использованы, чтобы соединить Лекарственную группу с Линкерной группой. Расширители, Отщепляемые группы, и Разделители более подробно описаны ниже.

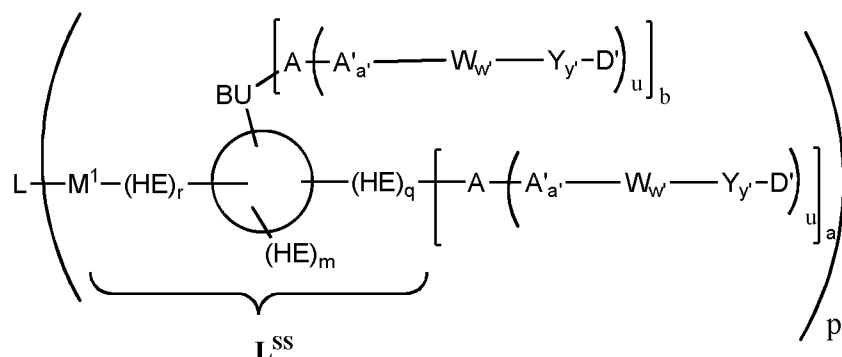
Разветвленные линкеры также предусмотрены в настоящем изобретении. Итак, в одном варианте Расширитель сконструирован таким образом, чтобы позволить разветвление в пределах Линкерной группы, *например* присоединение более чем одной Лекарственной группы или Метки или Стабилизатора к каждой самостабилизирующей линкерной области, как представлено следующей формулой:



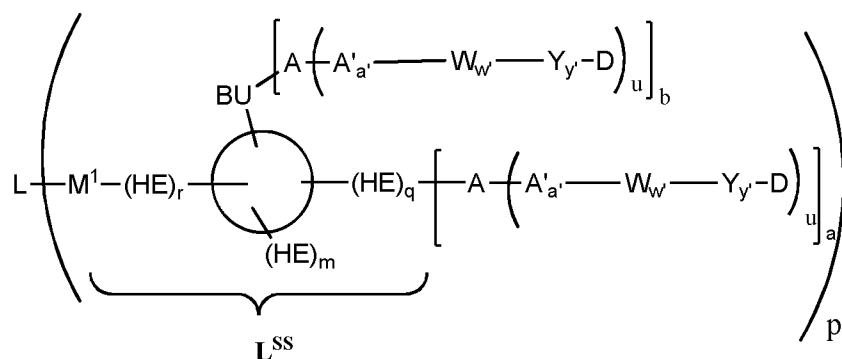
где волнистая линия показывает участок присоединения к самостабилизирующей

линкерной области, -W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10); A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; и a' равен 0 или 1. Каждый A', W, Y, и D' может быть тем же самым или другим. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через ту же самую или отличающуюся от нее функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах D' - Лекарственная группа D.

Типичные Конъюгаты Лиганд - Функциональное Средство или конъюгаты Лиганд-Лекарство, содержащие линкеры с прямой или разветвленной цепью, имеют следующие формулы:



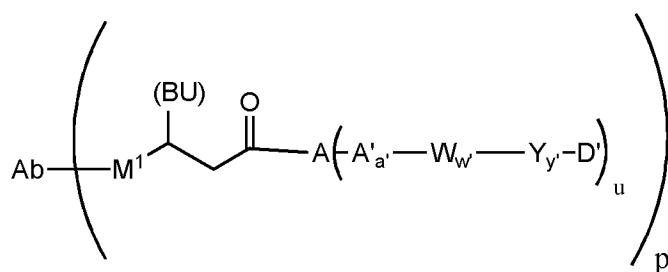
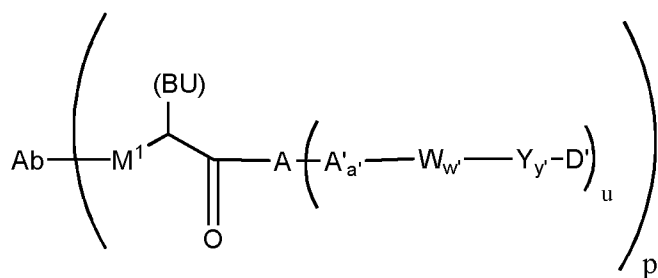
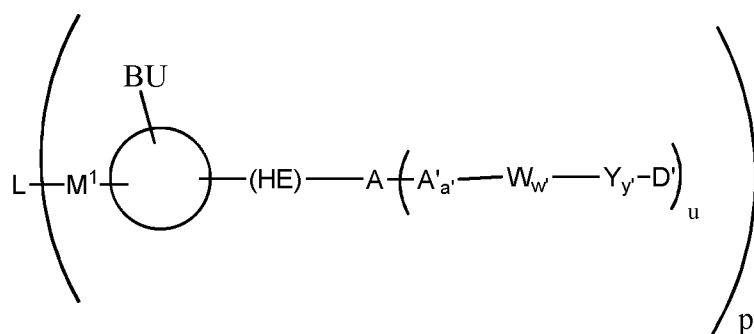
или

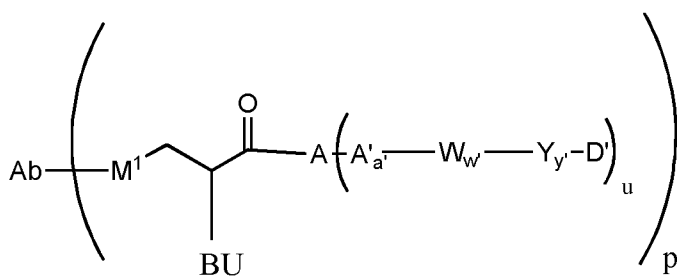


или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где каждый из L, M^1 , HE, BU, D', и индексы p , a , b , m , q , и r имеют значения, предложенные для Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, D - Лекарственная группа, круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D' (или D в зависимости от ситуации); -W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и

и равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10), где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A' , W , Y , и D' (или D в зависимости от ситуации) может быть тем же самым или другим. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через ту же самую или отличающуюся от нее функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1 и a' равен 0. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В каждом из этих отдельных вариантов реализации круг может изображать каркас, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен) или C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен является прямоцепочечным или разветвленным.

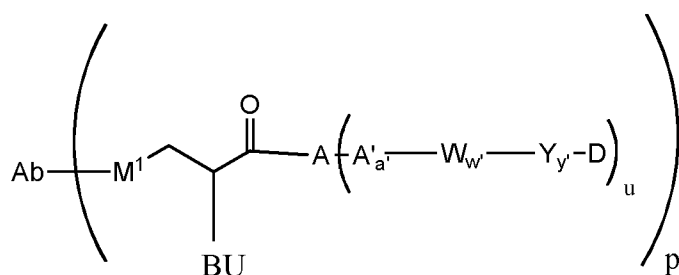
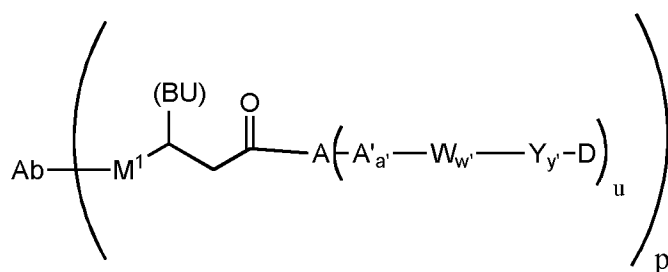
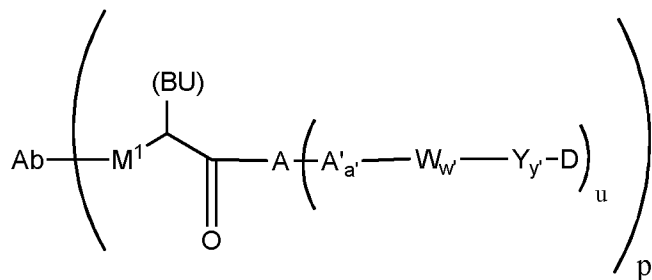
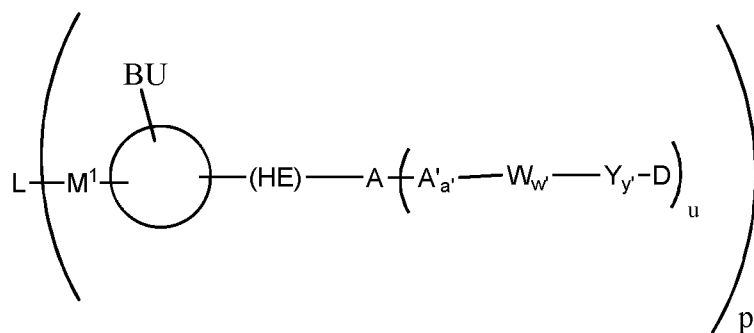
Конъюгаты Лиганд - Функциональное Средство, содержащие линкеры или с прямой, или с разветвленной цепью, могут быть представлены следующими формулами:





или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где каждый из L, M¹, HE, BU, D', и индекс p имеют значения, предложенные для Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D', -W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и u равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10), где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A', W, Y, и D' может быть тем же самым или другим. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через ту же самую или отличающуюся от нее функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В некоторых предпочтительных вариантах реализации BU выбирают из группы, состоящей из –(CH₂)_xNH₂, –(CH₂)_xNHR^a, и –(CH₂)_xNR^a₂, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимиды (гидролизованного или негидролизованного). В некоторых таких вариантах X равен 0-4 и каждый R^a представляет собой C₁₋₆ алкил.

Конъюгаты Лиганд-Лекарство, содержащие линкеры или с прямой, или с разветвленной цепью, могут быть представлены следующими формулами:

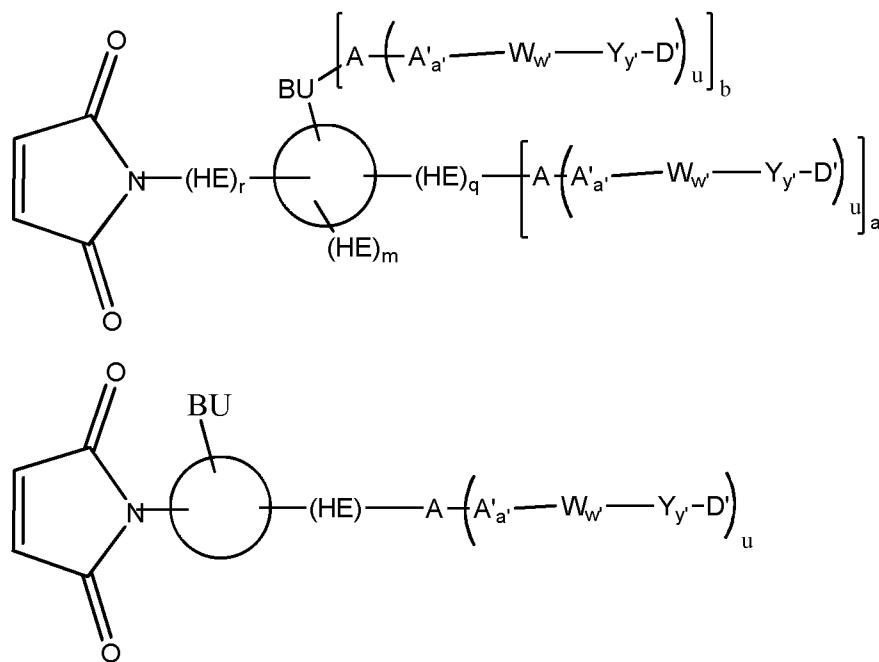


или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где каждый из L, M¹, HE, BU, и индекс p имеют значения, предложенные для Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, D - Лекарственная группа, круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D, -W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и u равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10), где, когда u равен от 2 до 20 A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A', W, Y, и D может быть одинаковым или может отличаться от других. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через ту же

самую или отличающуюся функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В некоторых предпочтительных вариантах реализации BU выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и

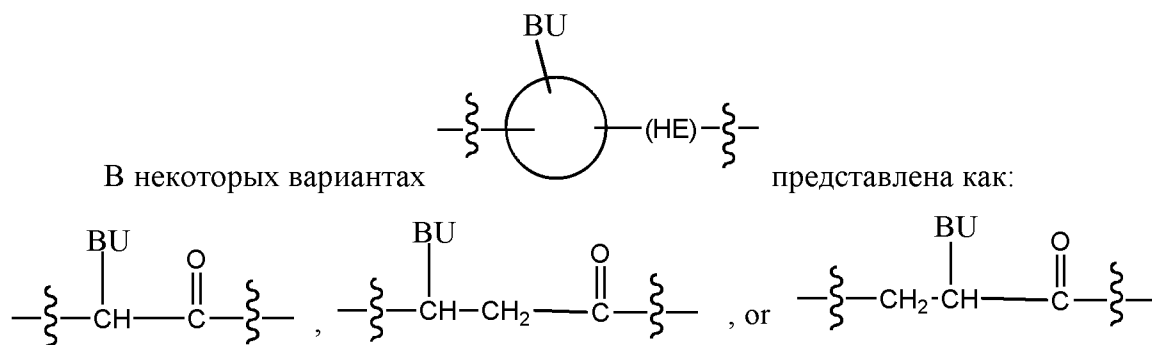
$-(CH_2)_xNR^a$, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного). В некоторых таких вариантах X равен 0-4 и каждый R^a представляет собой C_{1-6} алкил.

Конъюгаты Линкер-Функциональное средство, содержащие линкеры с прямой или с разветвленной цепью, могут быть представлены следующими формулами:



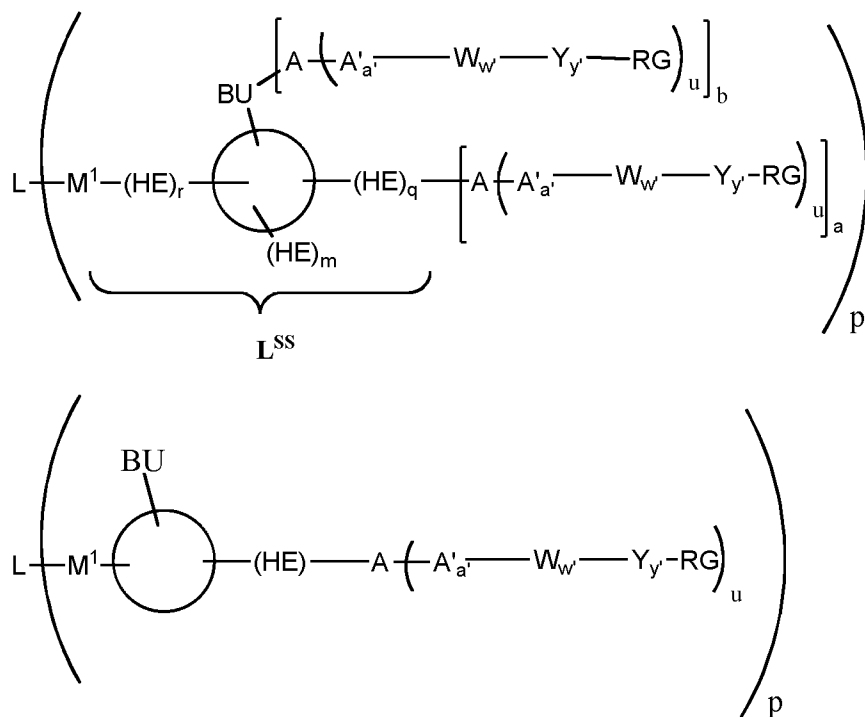
или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где каждый из HE, BU, D', и индексы p , a , b , m , q , и g имеют значения, предложенные для Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарил, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D'; W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и

и равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10, где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A' , W , Y , и D' может быть одинаковым или может отличаться от других. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через одну и ту же или отличающуюся функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В каждом из этих отдельных вариантов реализации круг может изображать остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен) или C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен является прямоцепочечным или разветвленным. В каждом из этих отдельных вариантов реализации D' может быть D .



В некоторых таких вариантах D' – это D . В некоторых предпочтительных вариантах реализации BU выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимиды (гидролизованного или негидролизованного). В некоторых таких вариантах X равен 0-4 и каждый R^a представляет собой C_{1-6} алкил.

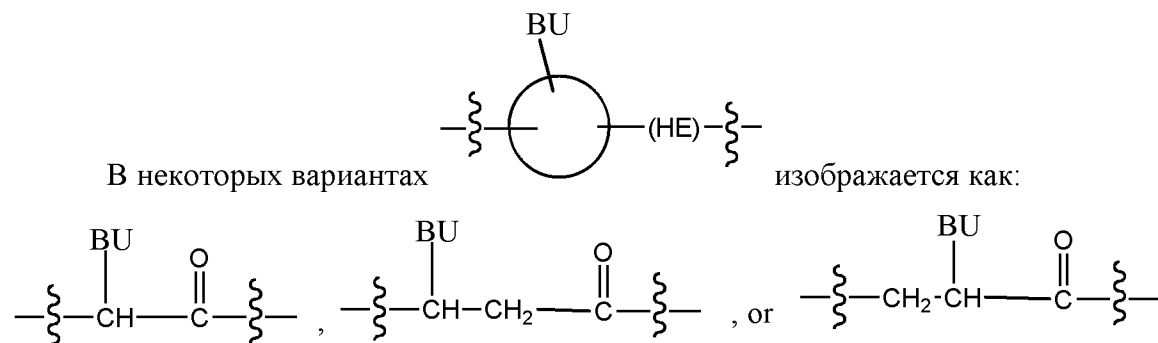
Конъюгаты Лиганд-Линкер, содержащие разветвленные или неразветвленные линкеры, могут быть представлены следующими формулами:



или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), где каждый из L, M¹, HE, BU, и индексы p, a, b, m, q, и r имеют значения, предложенные для Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D; RG - реакционноспособная группа (содержащая

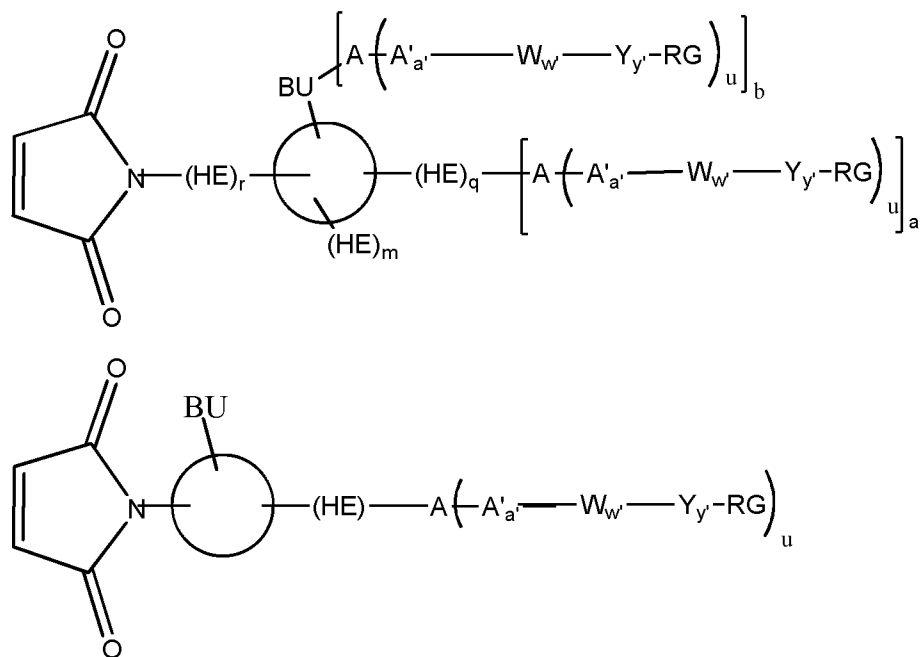
реакционноспособный участок) на конце $-\xi-A-A'_{a'}-W_{w'}-Y_{y'}-\xi-$, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы (или, в качестве варианта, Метки или Стабилизатора), W - - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и u равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10), где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый из A', W, Y, и D может быть одинаковым или может отличаться от других. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через одну и ту же или отличающуюся функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В каждом из этих отдельных вариантов реализации круг может изображать остов, который представляет собой C₁₋₈

алкилен или C₁₋₈ гетероалкилен (предпочтительно C₁₋₄ алкилен или C₁₋₄ гетероалкилен) или C₁₋₃ алкилен или C₁₋₃ гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.



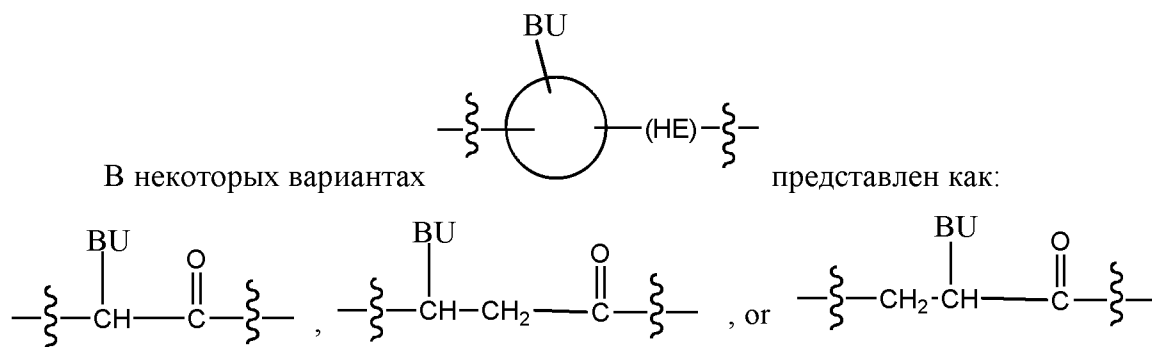
В некоторых предпочтительных вариантах реализации BU выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и атомом азота сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного). В некоторых таких вариантах x равен 0-4 и каждый R^a представляет собой C₁₋₆ алкил.

Разветвленные или неразветвленные Линкеры могут быть представлены следующими формулами:



или представляют собой их соль (например, фармацевтически приемлемую соль), каждый из остова, HE, BU, и индексы a , b , m , q , и g имеют значения, предложенные для

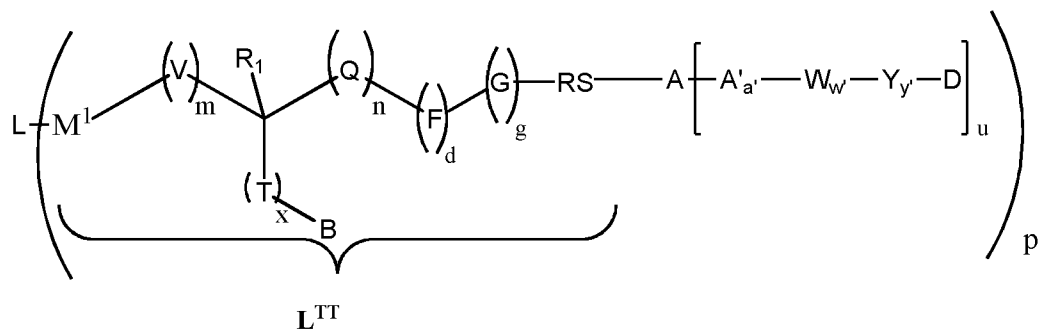
Формулы I и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы I, круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A, W, Y или D; RG - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на конце $-\xi-A-A'-W-Y-\xi-$, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы (или, в качестве варианта, Метки или Стабилизатора), W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и u равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10), где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A', W, Y, и D может быть одинаковым или отличаться от других. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через одну и ту же или отличающуюся функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10). В каждом из этих отдельных вариантов реализации круг может изображать каркас, который представляет собой C₁₋₈ алкилен или C₁₋₈ гетероалкилен (предпочтительно C₁₋₄ алкилен или C₁₋₄ гетероалкилен) или C₁₋₃ алкилен или C₁₋₃ гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.



В некоторых предпочтительных вариантах реализации BU выбирают из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число от 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галоалкила, или две R^a группы объединены азотом, к которому они присоединены, чтобы образовать азетидинильную, пирролидинильную или пиперидинильную группу, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием Основной группы и

атомом азота сукцинимиды (гидролизованного или негидролизованного). В некоторых таких вариантах X равен 0-4 и каждый R^a представляет собой C₁₋₆ алкил.

В некоторых других вариантах типичные конъюгаты Лиганд- Лекарство, содержащие линкеры или с прямой, или с разветвленной цепью, имеют следующие формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль где каждый из L, M¹, V, R¹, T, B, Q, F, G, и RS и индексы p, m, x, n, d, и g имеют значения, предложенные для Формулы III и любых из отдельных вариантов реализации для Формулы III, L - Лигандная группа, W- - необязательная Отщепляемая группа, индекс w' равен 0 или 1; -Y- - необязательная Разделительная группа, индекс y' равен 0 или 1, A - Расширитель, A' - необязательный компонент Расширителя на конце A; a' равен 0 или 1; и u равен от 1 до 20 (предпочтительно от 1 до 10) где, когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать. Каждый A', W, Y, и D может быть одинаковым или отличаться от других. Каждая Отщепляемая группа может быть присоединена к Расширителю (или A или A') через одну и ту же или отличающуюся функциональную группу на Расширителе. В некоторых вариантах w' равен 1. В некоторых вариантах w' равен 1 и a' равен 0. В вариантах, где линкер не разветвлен, u равен 1, a' равен 0, и A может присутствовать или отсутствовать. В других вариантах, где линкер разветвлен, u равен от 2 до 20 (предпочтительно от 2 до 10).

Расширители, Отщепляемые группы, и Разделители более подробно описываются ниже.

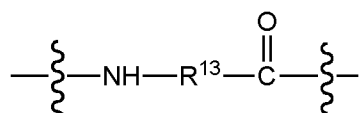
Расширитель

Расширитель (-A-), когда присутствует, расширяет каркас Линкерной группы, чтобы обеспечить большее расстояние между самостабилизирующейся линкерной областью и Лекарственной группой. Расширитель способен связывать самостабилизирующуюся линкерную область с Отщепляемой группой, когда отщепляемая группа присутствует, самостабилизирующуюся линкерную область к Разделителю, когда Отщепляемая группа отсутствует, но Разделитель присутствует, и самостабилизирующуюся линкерную область с Лекарственной группой, когда

отсутствуют и Отщепляемая группа, и Разделитель. Как описано, Расширитель способен к присоединению более, чем одной Отщепляемой группы, Разделителя, и/или Лекарственной группы.

Расширитель может также изменять физиологические свойства Лекарства-Линкера в зависимости от компонентов Расширителя. В некоторых вариантах Расширитель добавляют, чтобы повысить растворимость Лекарства-Линкера, и тогда Расширитель содержит одну или несколько групп, повышающих растворимость, таких, как ионные группы или водорастворимые полимеры. Водорастворимое обычно включает в себя любой сегмент или полимер, который растворим в воде при комнатной температуре, и включает в себя поли(этилен)гликолевые группы, а также другие полимеры, такие, как полиэтиленимины.

Расширитель может содержать одну или несколько расширяющих групп. Типичные расширяющие группы включают в себя, например, $-\text{NH}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{NH}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен- $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{NH}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен- $\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-\text{CH}_2$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_s-(\text{CH}_2)_s$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_s-(\text{CH}_2)_s-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_s$ -, $-\text{NH}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ карбоцикло})$ -, $-\text{NH}-(\text{ариленин})$ -, и $-\text{NH}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ гетероцикло})$ -, где каждый независимо равен 1-10. Типичной расширяющей группой, содержащей карбонильную группу для связывания с остатком Линкерной группы или Лекарственной группы, является следующая:



где R^{13} представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{C}_3-\text{C}_8$ карбоцикло-, $-\text{ариленин}$ -, $-\text{C}_1-\text{C}_{30}$ гетероалкилен-, $-\text{C}_3-\text{C}_8$ гетероцикло-, $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-ариленин-, $-\text{ариленин}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен- $(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ карбоцикло})$ -, $-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ карбоцикло})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен- $(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ гетероцикло})$ -, $-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ гетероцикло})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}(-\text{CH}_2)_{1-3}$ -, или $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_{1-10}(-\text{CH}_2)_{1-3}$ -. В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен- или $-\text{C}_1-\text{C}_{30}$ гетероалкилен-. В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}(-\text{CH}_2)_{1-3}$ -, или $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_{1-10}(-\text{CH}_2)_{1-3}$ -. В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-полиэтиленгликоль, или полиэтиленимин.

Нерасщепляемые системы высвобождения лекарства известны в данной области и могут быть адаптированы для использования со самостабилизирующимися линкерными областями настоящего изобретения, такими, как Расширители и/или Разделители. Нерасщепляемый линкер способен к связыванию Лекарственной группы с Лигандом в

основном стабильным и ковалентным образом и в основном устойчив к индуцируемому кислотой расщеплению, индуцируемому светом расщеплению, индуцируемому пептидазой или эстеразой, и расщеплению дисульфидной связи. Лекарство высвобождается из Конъюгатов Лиганд – Лекарство, содержащих нерасщепляемые линкеры, по альтернативным механизмам, таким, как протеолитическое разложение лиганда.

Поперечно-сшивающие реагенты, которые образуют нерасщепляемые линкеры между майтанзиноидными лекарствами и лигандами, хорошо известны в данной области и могут быть адаптированы для использования в настоящем документе. Типичные поперечно-сшивающие реагенты, которые образуют нерасщепляемые линкеры между майтанзиноидными лекарствами и лигандами, содержат фрагмент молекулы, основанный на малеимиде или галоацетиле. Они включают в себя N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), сложный эфир κ -малеимидоундекановой кислоты и N-сукцинимидила (KMUA), сложный эфир γ -малеимидомасляной кислоты и N-сукцинимидила (GMBS), сложный эфир ϵ -малеимидокапроновой кислоты и N-гидроксисукцинимидила (EMCS), m-малеимидобензоил-N-сложный эфир гидроксисукцинимидила (MBS), N-(альфа-малеимидоацетокси)-сложный эфир сукцинимидила [AMAS], сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)-бутират (SMPB), и N-(п-малеимидофенил)изоцианат (PMPI), N-сукцинимидил-4-(йодацетил)-аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил йодацетат (SIA), N-сукцинимидил броацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP). Дополнительные Расширители для использования в сочетании с самостабилизирующейся линкерной областью настоящего изобретения можно найти, например, в патенте США № 8 142 784, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте и для любых целей.

Отщепляемая группа

Отщепляемая группа (-W-), когда присутствует, способна к связыванию самостабилизирующейся линкерной области с Разделителем, когда Разделитель присутствует, или самостабилизирующейся линкерной области с Лекарственной группой, когда Разделитель отсутствует. Связь от самостабилизирующейся линкерной области к Разделителю или к Лекарственной группе может быть непосредственно от самостабилизирующейся линкерной области, когда Расширитель отсутствует, или через

Расширитель, если Расширитель присутствует.

В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа будет непосредственно сконъюгирована с самостабилизирующей линкерной областью на одном конце и к Лекарственной группе на другом конце. В других вариантах реализации Отщепляемая группа будет непосредственно сконъюгирована с Расширителем на одном конце и с Лекарственной группой на другом конце. В еще одних вариантах реализации Отщепляемая группа будет непосредственно сконъюгирована с Расширителем на одном конце и с Разделителем на другом конце. В еще одних вариантах реализации Отщепляемая группа будет непосредственно сконъюгирована со самостабилизирующей линкерной областью на одном конце и с Разделителем на другом конце. Любая из конкретно описанных самостабилизирующихся линкерных областей, описанных в настоящем документе, может быть использована в этих вариантах реализации.

Отщепляемая группа способна к образованию поддающейся расщеплению связи с Лекарственной группой или Разделителем. Реакционноспособные группы для образования расщепляемых связей могут включать в себя, например, сульфгидрильные группы, чтобы образовывать дисульфидные связи, альдегидные, кето-, или гидразиновые группы, чтобы образовывать гидразоновые связи, карбоксильные или амино группы, чтобы образовывать пептидные связи, и карбоксильные или гидроксигруппы, чтобы образовывать сложноэфирные связи.

Природа Отщепляемой группы может варьироваться в широких пределах. Например, расщепляемые линкеры включают в себя линкеры, содержащие дисульфид, расщепляемый путем дисульфидного обмена, неустойчивые в кислоте линкеры, которые способны к расщеплению при кислом pH, и линкеры, которые расщепляются гидролазами, пептидазами, эстеразами и глюкуронидазами.

В некоторых вариантах структура и последовательность Отщепляемой группы такова, что группа отщепляется под действием ферментов, присутствующих в целевом сайте. В других вариантах Отщепляемая группа может быть отщепляемой другими механизмами. Отщепляемая группа может содержать один или несколько сайтов отщепления.

В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа будет содержать одну аминокислоту или одну или более последовательности аминокислот. Отщепляемая группа может содержать, например, монопептидную, дипептидную, трипептидную, тетрапептидную, пентапептидную, гексапептидную, гептапептидную, октапептидную, нонапептидную, декапептидную, ундекапептидную или додекапептидную группу.

Каждая аминокислота может быть природной или неприродной и/или α D- или L-

изомером, конечно, в случае, когда имеется расщепляемая связь. В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа будет содержать только природные аминокислоты. В некоторых вариантах Отщепляемая группа будет содержать от 1 до 12 аминокислот в непрерывной последовательности.

В некоторых вариантах реализации 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, селеноцистеина, орнитина, пеницилламина, β -аланина, аминокановой кислоты, аминокиново́й кислоты, аминокандиоловой кислоты, аминокбензойной кислоты, аминок-гетероциклической алкановой кислоты, гетероциклической карбоновой кислоты, цитруллина, статина, диаминокановой кислоты, и их производных. В некоторых вариантах реализации 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 реализации 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, триптофана и валина. В некоторых вариантах реализации каждая аминокислота выбрана из протеиногенных или непротеиногенных аминокислот.

В другом варианте реализации каждая аминокислота независимо выбрана из группы, состоящей из следующих L-(природных) аминокислот: аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана и валина.

В другом варианте реализации каждая аминокислота независимо выбрана из группы, состоящей из следующих D-изомеров этих природных аминокислот: аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана и валина.

В некоторых вариантах реализации связь между Отщепляемой группой и Лекарственной группой может быть разрушена ферментативно одним или более ферментами, включая связанную с опухолью протеазу, чтобы освободить Лекарственную

группу (-D), которая в одном варианте реализации протонируется *in vivo* в момент высвобождения, чтобы предоставить Лекарство (D).

Полезные Отщепляемые группы могут быть сконструированы и оптимизированы по избирательности для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, связанной с опухолью протеазой. В одном варианте реализации соединение (или связь) между Отщепляемой группой и Лекарственной группой или Разделителем таково, что расщепление катализируется катепсином В, С и D, или плазминовой протеазой.

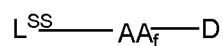
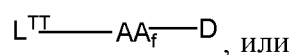
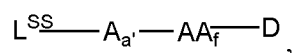
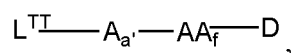
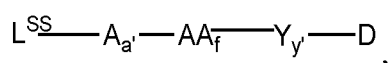
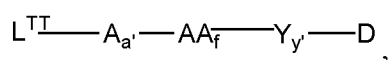
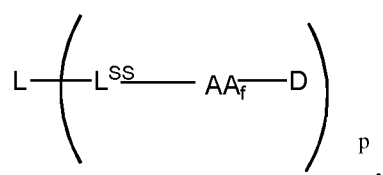
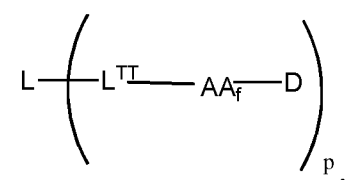
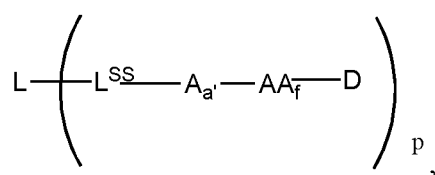
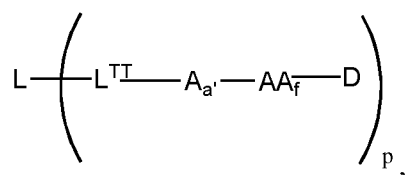
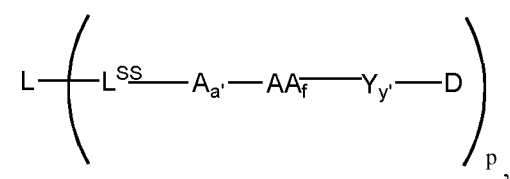
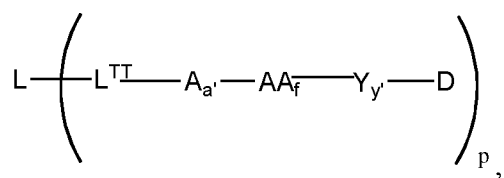
В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа может содержать только природные аминокислоты. В других вариантах реализации Отщепляемая группа может содержать только неприродные аминокислоты. В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа может содержать природную аминокислоту, соединенную с неприродной аминокислотой. В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа может содержать природную аминокислоту, соединенную с D-изомером природной аминокислоты.

Типичная Отщепляемая группа является дипептидом -Вал-Цит-, -Фен-Лиз- или -Вал-Ала.

В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа будет содержать один пептид и будет содержать от 1 до 12 аминокислот. В некоторых таких вариантах реализации пептид будет сконъюгирован непосредственно с Лекарственной группой и Разделитель будет отсутствовать. В некоторых таких вариантах реализации Расширитель и Разделитель будут отсутствовать. В одном варианте пептид будет дипептидом.

В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа $-W_w-$ будет представлена как $-(AA-)_{1-12}-$, или $(-AA-AA-)_{1-6}$, где AA в каждом случае независимо выбран из природных или неприродных аминокислот. В одном варианте AA в каждом случае независимо выбран из природных аминокислот. Специалист в данной области оценит, что аминокислоты обычно присоединены к Лекарственной группе или Разделителю через функциональные группы, присутствующие в аминокислоте, например, в ее карбоновокислотном или amino-конце.

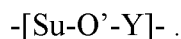
В некоторых таких вариантах Конъюгаты Лиганд-Лекарство и Лекарство-Линкеры представлены следующими формулами или их солями, где L, L^{SS} , L^{TT} A, a', AA, Y, y', D, и r - как определено в любом из вариантов реализации описанных в настоящем документе и f – целое число от 1 до 12:



Следует понимать, что хотя в формулах выше это не отражено, такие формулы могут быть модифицированы, как описывается в настоящем документе, чтобы включать в себя разветвленные линкеры, *т.е.* несколько Лекарственных групп может быть присоединено к каждой самостабилизирующейся линкерной области.

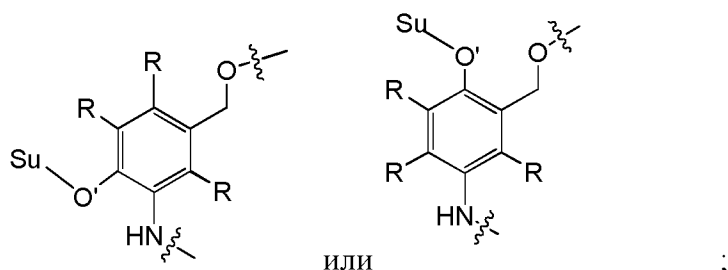
В других вариантах Отщепляемая группа будет содержать глюкуронидную группу, предпочтительно 1 или 2 глюкуронидные группы. В некоторых таких вариантах реализации Глюкуронидная группа содержит фрагмент молекулы сахара (Su)

соединенную через гликозидный мостик ($-O'$ -) с саморасщепляющимся Разделителем:

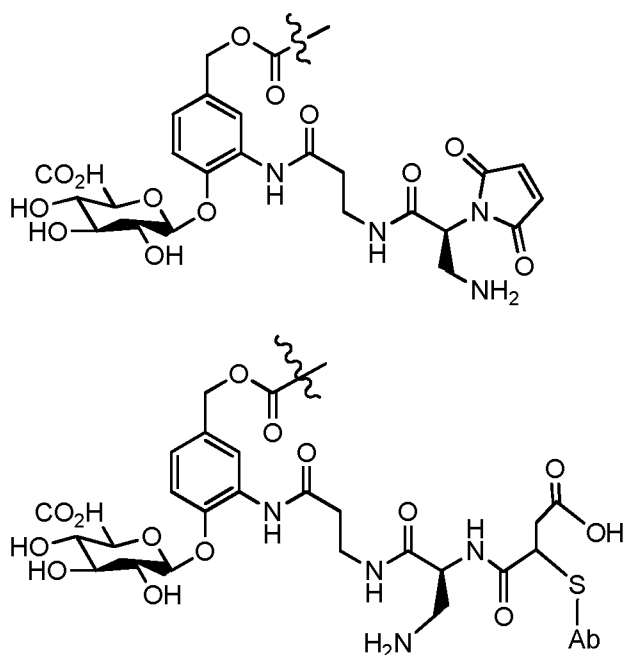


Гликозидный мостик ($-O'$ -) обычно является сайтом расщепления β -глюкуронидазой, например, мостиком, расщепляемым лизосомальной β -глюкуронидазой человека.

В некоторых вариантах $-[Su-O'-Y]-$ представлен следующей формулой:



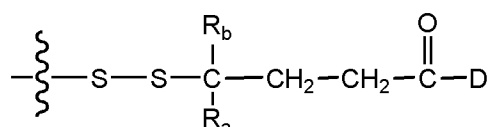
где Su - фрагмент молекулы сахара, $-O'$ - изображает гликозидный мостик; каждый R независимо является водородом, галогеном, $-CN$, или $-NO_2$; где волнистый мостик, прилегающий к атому азота, показывает ковалентное присоединение к Расширителю или к Лиганду и волнистый мостик, прилегающий к кислороду, показывает ковалентное присоединение к Разделителю или к Лекарственной группе. Типичная Линкерная группа, содержащая глюкуронид до конъюгации с антителом и после конъюгации – такая, как ниже, где волнистая линия показывает присоединение к Лекарственной группе или к Разделителю и Ab изображает антитело и S – атом серы антитела. Следует понимать, что более чем одна самостабилизирующаяся область может быть присоединена к каждому антителу:



В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа сама будет содержать атом серы, который способен к образованию связи с атомом серы Разделителя или

Лекарственной группы, чтобы образовать дисульфид или блокированный дисульфид. Расщепление происходит между двумя атомами серы дисульфида. В некоторых таких вариантах реализации один из атомов серы отщепляется от Лекарственной группы и, так как не предоставлен другой механизм высвобождения, другой атом серы остается присоединенным к Лекарственной группе. Линкерная группа, содержащая Отщепляемую группу, имеющую атом серы, способна к образованию связи с атомом серы Разделителя или Лекарственной группы, чтобы образовать дисульфид или блокированный дисульфид.

Типичные линкеры включают в себя, например, следующие Лекарство-Линкеры, где волнистая линия показывает место присоединения к остатку Линкерной группы, D - лекарство (майтанзиноид), и R_a и R_b независимо выбраны из H или метила.



Ряд дисульфидных линкеров известен в данной области и может быть адаптирован для использования в настоящем изобретении, включая, например, те, что могут быть образованы, используя 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-пиридил-дитио)толуол), и SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридил-дитио)пентаноат). (См., например, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4 880 935.)

В некоторых вариантах реализации расщепляемый линкер чувствителен к pH и будет содержать, например, кислотонеустойчивый линкер, который поддается гидролизу в лизосоме (*например*, а гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, или кетальная группа) могут быть использованы. (*См., например*, патенты США №№ 5 122 368; 5 824 805; 5 622 929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, например, такого, как в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительного pH лизосомы.

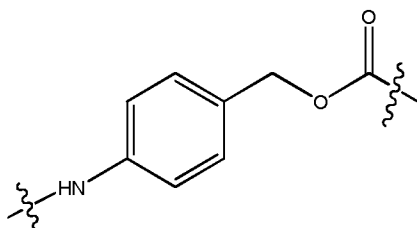
В некоторых вариантах реализации Отщепляемая группа будет сконъюгирована непосредственно с Лекарственной группой и Разделитель будет отсутствовать, и Отщепляемая группа будет присоединена к Лекарственной группе через расщепляемую пептидную, дисульфидную или гидразоновую связь.

Разделитель

Разделитель (-Y-), когда присутствует, связывает Отщепляемую группу с Лекарственной группой или Расширитель с Лекарственной группой или самостабилизирующую линкерную область с Лекарственной группой. Подобно Расширителю, Разделитель, когда присутствует, может действовать, чтобы расширить каркас Линкерной группы. Разделитель может содержать несколько саморасщепляющихся или не саморасщепляющихся групп. В некоторых вариантах реализации Разделитель содержит одну или более саморасщепляющуюся группу. В этом контексте термин “саморасщепляющаяся группа” относится к бифункциональной химической структуре, которая способна ковалентно связывать вместе два пространственно разделенных фрагмента в обычно стабильную трехчленную молекулу. Она будет спонтанно отделяться от второго химического фрагмента, если нарушается ее связь с первым фрагментом. В других вариантах реализации Разделитель не является саморасщепляющимся. В этих вариантах реализации часть или все Разделители остаются присоединенными к Лекарственной группе.

В некоторых вариантах реализации -Y- является саморасщепляющейся группой и связана с Отщепляемой группой через метиленовый атом углерода саморасщепляющейся группы, и присоединена непосредственно к Лекарственной группе через карбонат, карбамат или простую эфирную группу.

В некоторых вариантах реализации -Y- представляет собой п-аминобензильную спиртовую (РАВ) группу, чей фениленовый участок необязательно замещен -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, -нитро или -цианогруппой. В другом варианте реализации -Y- может быть карбонатной группой. Незамещенная РАВ группа – как нижеследующая:



Другие примеры саморасщепляющихся групп включают в себя, но не ограничиваются этим, ароматические соединения, которые электронно сходны с РАВ группой, такие, как производные 2-амидоимидазол-5-метанола (см., например, *Нану et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) и орто или пара-аминобензилацетали. Могут быть использованы Разделители, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидных связей, такие, как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (см.,

например, Rodrigues *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, Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). Отщепление аминоксодержащих лекарств, которые замещены в α -положении глицина (см., например, Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447), также являются примерами саморасщепляющихся групп.

Другие подходящие Разделители раскрываются в опубликованной заявке на патент США № 2005-0238649, раскрытие которой включено посредством ссылки в настоящий документ.

Типичные Расширители, Отщепляемые группы и Разделители, которые могут быть использованы с настоящими композициями и способами, описаны в международных патентах WO 2004010957, WO 2007/038658, WO 2005/112919, патентах США № 6 214 345, 7 659 241, 7 498 298, 7 968 687, 8 163 888, и Публикации США № 2009-0111756, 2009-0018086, 2009-0274713, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки и во всех отношениях.

В вариантах реализации в которых Конъюгаты сконъюгированы со Стабилизатором или Меткой вместо Лекарственной группы, необязательная вторичная линкерная область обычно будет отсутствовать. В вариантах реализации где присутствует Вторичная Линкерная Область, Расширитель в основном будет присутствовать, но Отщепляемая группа и Разделитель будут отсутствовать. Расширитель будет расширять каркас Линкерной группы, чтобы обеспечить большее расстояние между самостабилизирующей областью и Меткой или Стабилизатором. В таких вариантах Расширитель способен к связыванию самостабилизирующей линкерной области с Меткой или Стабилизатором.

Содержание Лекарства

Количество самостабилизирующихся линкеров на Лиганд отображается индексом r . В вариантах реализации в которых линкеры не разветвленные, r обозначает количество молекул лекарство-линкер (или молекул метка-линкер или стабилизатор-линкер) на молекулу Лиганда (например, антитела). В зависимости от контекста, r может обозначать среднее количество самостабилизирующихся линкеров на Лиганд (или в вариантах реализации где линкеры не разветвленные, среднее количество молекул лекарство-линкер (или молекул метка-линкер или стабилизатор-линкер) на Лиганд (например, антитело). Переменная r находится в интервале от 1 до 20, обычно от 1 до 12, 1 до 10 и составляет предпочтительно от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации когда r обозначает среднее количество самостабилизирующихся линкеров на антитело, r

находится в интервале от около 2 до около 5. В некоторых вариантах реализации p составляет около 2, около 4, или около 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации когда p обозначает среднее количество молекул лекарство-линкер на антитело, p находится в интервале от около 2 до около 5. В некоторых вариантах реализации p составляет около 2, около 4, или около 8. Количество D' на самостабилизирующиеся линкеры обозначается индексом u , u находится в интервале от 1 до 10.

Среднее количество Лекарственных групп на Лигандную группу в препарате, полученном реакцией конъюгации, может быть оценено обычными средствами, такими, как масс-спектроскопия, метод ELISA (ТИФА), гидрофобная хроматография и ВЭЖХ. Количественное распределение конъюгатов Лекарство-Линкер-Лиганд в пересчете на p также может быть определено. В некоторых случаях отделение, очистка и характеристика гомогенных конъюгатов Лиганд- Лекарство, в которых p составляет некоторое значение от Конъюгата Лиганд-Лекарство с другими содержаниями лекарства может быть достигнуто посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ или электрофореза.

Самостабилизирующаяся Линкерная Область (L^{SS} или L^{TT}) и Скорости Гидролиза

Самостабилизирующаяся линкерная область связывает Лигандную группу с Расширителем, если Расширитель присутствует, связывает Лигандную группу с Отщепляемой группой, если Расширитель отсутствует, и Отщепляемая группа присутствует, связывает Лигандную группу с Разделителем, если Расширитель и Отщепляемая группа отсутствуют и Разделитель присутствует, или связывает Лигандную группу с D' (например, с Лекарственной группой) если Расширитель, Отщепляемая группа и Разделитель отсутствуют. В некоторых вариантах реализации Расширитель, Отщепляемая группа, и Разделитель будут отсутствовать и самостабилизирующаяся линкерная область будет сконъюгирована непосредственно с D' (например, с Лекарственной группой). В других вариантах реализации будет присутствовать один или более Расширитель, Отщепляемая группа, и Разделитель.

Скорость, при которой тиозамещенный сукцинимид Самостабилизирующегося Линкера как части Конъюгата Лиганд-Лекарство подвергается гидролизу, может быть определена количественно, используя период полугидролиза. Период полугидролиза означает время, необходимое для того, чтобы гидролизовать половину интересующего соединения, *т.е.*, подвергнуть кольцо открытию в заявленных условиях (например, pH 7,4 и 22°C). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, период полугидролиза тиозамещенного сукцинимиды Самостабилизирующейся Линкерной

группы составляет менее чем 4 часа, предпочтительно менее чем 3 часа, ещё более предпочтительно, менее чем 2 часа, менее чем 1 час, менее чем 45 минут, менее чем 30 минут, менее чем 15 минут используя следующую методику анализа и заявленные условия.

Скорость реакции гидролиза малеимидного лекарственного линкера, следующая за конъюгацией с цистеинами антитела может быть определена масс-спектрометрией, так как гидролизированный продукт имеет молекулярную массу на 18 дальтон больше, чем негидролизированный конъюгат. Восстановление межцепочечных дисульфидов человеческого иммуноглобулина IgG1 порождает одиночный восстановленный цистеин на легкой цепи и три восстановленных цистеина на тяжелой цепи. Самостабилизирующийся малеимидный лекарство-линкер может затем быть сконъюгирован с восстановленным антителом при pH 7,4 и 22°C и введен в электрораспылительный масс-спектрометр высокого разрешения через колонку для обращенно-фазовой ВЭЖХ, которая разделяет конъюгированные легкие и тяжелые цепи. Массы конъюгированных легких и тяжелых цепей могут, таким образом, быть измерены, и интенсивности пиков определены стандартным программным продуктом, обрабатывающим данные масс-спектрометрии (например, MassLynx). Осуществлением серии впрысков в течение некоторого времени может быть отслежено исчезновение пика, соответствующего массе исходного, негидролизованного конъюгата, и появление пика, соответствующего массе гидролизованного конъюгата, определены интенсивности пиков и подсчитан процент гидролизованного конъюгата в каждый момент времени. Путем построения графика зависимости процента гидролиза от времени, генерируется кривая (например, используя PRISM), которая будет соответствовать стандартному уравнению экспоненциального явления, которое включает в себя параметр полупериод.

В некоторых вариантах самостабилизирующийся Линкер будет сконструирован так, что малеимидный компонент Самостабилизирующегося Линкера в основном не будет подвергаться гидролизу до конъюгации с Лигандной группой.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения период полугидролиза тиазамещенного сукцинимиды Самостабилизирующегося Линкера равен от около 5 или около 10 минут до около 24 часов, предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 12 часов, более предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 5 часов, более предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 2,5 часов, ещё более предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 1 часа, даже более предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 30 минут, ещё более предпочтительно от около 5 или около 10 минут до около 20 минут, и ещё более

предпочтительно от около 10 минут до около 15 минут при pH от около 7 до около 7.5 (например, 7,4) и температуре от около 22°C.

В некоторых таких вариантах реализации в которых период полугидролиза таков, как указано выше, гидролиз протекает до полного завершения. Гидролиз рассматривается как полный, если будет достигнуто 90% гидролиза тиозамещенного сукцинимиды. Предпочтительно, 95% или больше, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% гидролиза будет достигнуто. В некоторых вариантах реализации реакция гидролиза будет конкурировать с образованием дилактама и не достигнет завершения. В некоторых таких вариантах реализации по меньшей мере 90% продукта реакции будет сочетанием либо гидролизованного тиозамещенного сукцинимидного Конъюгата Лиганд-Лекарство, либо тиозамещенного дилактамового Конъюгата Лиганд-Лекарство. Предпочтительно по меньшей мере 95% или больше, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% продукта реакции будет сочетанием либо гидролизованного тиозамещенного Конъюгата Лиганд-Лекарство или тиозамещенного дилактамового Конъюгата Лиганд-Лекарство. Процент гидролиза может быть вычислен из данных масс-спектрометрии о конъюгате в конечный момент времени путем определения интенсивности пика, соответствующего массе исходного, негидролизованного конъюгата и интенсивности пика, соответствующего массе гидролизованного конъюгата, и используя сумму интенсивностей пика, чтобы определить процент гидролизованного и процент негидролизованного.

В дополнение к характеристике Конъюгата Лиганд-Лекарство по его периоду полугидролиза и/или эффективности реакции гидролиза, стабильность Конъюгата Лиганд-Лекарство может быть охарактеризована по способности Конъюгата Лиганд-Лекарство подвергаться реакции отщепления и для Лекарство-Линкера – быть перенесенным от Лигандной группы к альтернативному реакционноспособному тиолу, присутствующему вблизи от Конъюгата Лиганд-Лекарство. В некоторых вариантах реализации Лекарство-Линкер будет проявлять никакую или почти никакую диссоциацию от Лиганда при следующем анализе и указанных условиях. Фраза “почти никакая диссоциация от Лиганда” означает, что менее чем 40%, предпочтительно менее чем 20%, даже более предпочтительно менее чем 10%, или даже более предпочтительно менее чем 5% или менее чем 2% Лекарство-Линкера в образце диссоциирует от Лиганда.

Отщепление лекарство-линкера, содержащего ферментативно расщепляемый линкер от антитела может быть измерено в плазме *ex vivo* следующим способом. Конъюгат помещают в стерильную плазму и инкубируют при 37°C. В момент начала инкубации и в различные моменты времени от 1 часа до 1 недели или дольше, аликвоту удаляют при замораживании при -80°C. По завершении отбора образцы пропускают над

смолой со сродством к белку А, чтобы захватить антитело, смолу промывают буферным раствором, и затем лекарство высвобождают из захваченного антитела путем обработки соответствующим ферментом (например, папаином или протеиназой К для отщепляемых линкеров, основанных на пептиде). Высвобожденное лекарство может затем быть определено количественно по стандартной методологии ЖХ-МС, и количество лекарства, измеренное в каждый момент времени, делится на количество, измеренное для аликвоты перед инкубацией, чтобы определить процент лекарства, сконъюгированного с антителом, в каждый момент времени. Точность этого измерения может быть повышена включением внутреннего стандарта – конъюгата антитело-лекарство, который изготовлен с использованием меченого изотопами варианта того же лекарство-линкера, так что лекарство, освободившееся от него, может быть обнаружено в анализе ЖХ-МС независимо от лекарства, освободившегося из тестируемого лекарство-линкера с использованием различий в массе. Этот меченый изотопами внутренний стандарт конъюгата антитело-лекарство добавляют к каждому образцу в равных количествах непосредственно перед этапом захвата белком А. Количественное определение лекарства, освободившегося из тестируемого ADC, затем осуществляют радиометрически по сигналу от внутреннего сигнала обычными методиками ЖХ-МС.

Альтернативным способом оценки отщепления малеимидного лекарство-линкера от антитела (или другого лиганда) является инкубация конъюгата в буфере (например, фосфатном буфере) при несколько повышенном pH (например, pH 8.0) в присутствии большого избытка низкомолекулярного тиола (например, N-ацетилцистеина, NAC), который будет вступать в реакцию с любым малеимидом, который отщепляется от родительского конъюгата. Анализ ЖХ-МС может быть осуществлен, чтобы обнаружить и количественно определить лекарство-линкер, сконъюгированный с NAC, или родительский лиганд-конъюгат. В последнем случае отношение лиганд-конъюгата к неконъюгированному лиганду может быть измерено и будет оставаться постоянным в течение времени, если лиганд-конъюгат стабилен. Дополнительные способы предлагаются в разделе примеров.

Лечение Рака

Конъюгаты Лиганд-Лекарство полезны для ингибирования размножения клеток опухоли или раковых клеток, вызывая апоптоз у клеток опухоли или раковых клеток, или для лечения рака у пациента. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы таким образом в ряде протоколов лечения рака. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы, чтобы доставить лекарство к клетке опухоли или раковой клетке. Не желая связывать себя теорией, авторы изобретения полагают, что в одном варианте реализации

Лигандная группа Конъюгата Лиганд-Лекарство соединяется или ассоциируется с антигеном, ассоциируемым с клеткой опухоли или раковой клеткой, и Конъюгат Лиганд-Лекарство может быть захвачен (усвоен) внутри клетки опухоли или раковой клетки через опосредованный рецепторами эндоцитоз или другой механизм интернализации. Антиген может быть присоединен к клетке опухоли или раковой клетке или может быть внеклеточным белком матрикса, ассоциированным с клеткой опухоли или раковой клеткой. Сразу после попадания внутрь клетки через отщепление или несвязанный с отщеплением механизм, в зависимости от компонентов линкерной системы, лекарство высвобождается внутри клетки. В альтернативных вариантах реализации Лекарство или Лекарственная группа отщепляется от Конъюгата Лиганд-Лекарство снаружи клетки опухоли или раковой клетки, и Лекарство или Лекарственная группа впоследствии проникают в клетку.

Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут обеспечивать конъюгационно-специфичное нацеливание лекарства на опухоль или рак, тем самым уменьшая общую токсичность лекарства. В некоторых вариантах реализации Линкерные группы стабилизируют Конъюгаты Лиганд-Лекарство в крови, еще они способны высвободить лекарство сразу после попадания внутрь клетки.

В одном варианте реализации Лигандная группа присоединяется к клетке опухоли или раковой клетке.

В другом варианте реализации Лигандная группа присоединяется к клетке опухоли или антигену раковой клетки, который расположен на поверхности клетки опухоли или раковой клетки.

В другом варианте реализации Лигандная группа присоединяется к клетке опухоли или антигену раковой клетки, который расположен на белках внеклеточного матрикса, ассоциируемого с клеткой опухоли или раковой клеткой.

Специфичность Лигандной группы для той или иной клетки опухоли или раковой клетки может быть важна для определения тех видов опухолей или рака, которые будут лечиться наиболее эффективно. Например, конъюгаты лиганд-лекарство, содержащие BR96 Лигандную группу, могут быть полезны для лечения антиген-положительных карцином, включая карциномы легких, груди, толстой кишки, яичников, и поджелудочной железы. Конъюгаты Лиганд-Лекарство, содержащие анти-CD30 или анти-CD70 связывающую Лигандную группу, могут быть полезны для лечения гематологических злокачественных опухолей.

Другие частные типы рака, которые могут лечиться конъюгатами лиганд-лекарство, включают в себя, но не ограничиваются этим, типы, раскрытые в Таблице 1:

Таблица 1

Солидные опухоли, включающие в себя, но не ограниченные этим:

фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиальная саркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиальная саркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак почки, рак поджелудочной железы, рак костей, рак груди, рак яичников, рак простаты, рак пищевода, рак желудка, рак полости рта, рак носовой полости, рак гортани, сквамозная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома слюнной железы, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, рак легкого, эпителиальная карцинома, глиома, полиморфная глиобластома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, нейрома слухового нерва, олигодендроглиомы, менингиомы, рак кожи, меланома, нейробластома, ретинобластома

виды рака крови, включающие в себя, но не ограниченные этим:

острая лимфобластическая лейкемия “ALL”, острая лимфобластическая лейкемия В-клеток, острая лимфобластическая лейкемия Т-клеток, острая миелобластическая лейкемия “AML”, острая промиелоцитарная лейкемия “APL”, острая монобластическая лейкемия, острая эритролейкемическая лейкемия, острая мегакариобластная лейкемия, острая миеломоноцитарная лейкемия, острая нелимфоцитарная лейкемия, острая недифференцированная лейкемия, хроническая миелоцитарная лейкемия “CML”, хроническая лимфоцитарная лейкемия “CLL”, волосатоклеточная лейкемия, множественная миелома

острые и хронические лейкемии:

лимфобластная, миелогенная, лимфоцитарная, миелоцитарная лейкемии

Лимфомы:

Болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, истинная полицитемия

Множественная терапия рака

Раковые заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, опухоль, метастазы, или

другое заболевание или нарушение, характеризующееся неконтролируемым ростом клеток, может лечиться или тормозиться с использованием Конъюгата Лиганд-Лекарство.

В других вариантах реализации предлагаются способы лечения рака, включающие в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества Конъюгата Лиганд-Лекарство и химиотерапевтического средства. В одном варианте реализации химиотерапевтическое средство такое, с которым рак не признается не поддающимся лечению. В другом варианте реализации химиотерапевтическое средство такое, с которым рак признается неподдающимся лечению. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть введены пациенту, который также подвергался хирургическому вмешательству как средству лечения рака.

В некоторых вариантах реализации пациент также получает дополнительное лечение, например, радиотерапию. В особом варианте реализации Конъюгат Лиганд-Лекарство вводится параллельно с химиотерапевтическим средством или радиационной терапией. В другом особом варианте реализации химиотерапевтическое средство или радиационная терапия применяется перед или сразу после введения конъюгата лиганд-лекарство.

Химиотерапевтическое средство может быть введено в ходе серии процедур. Может быть введено любое одно или сочетание химиотерапевтических средств, такое, как в стандарте лечения.

Кроме того, способы лечения рака Конъюгатом Лиганд-Лекарство предлагаются как альтернатива химиотерапии или радиотерапии, когда химиотерапия или радиотерапия, как доказано или может быть доказано, слишком токсичны, *например* приводят к неприемлемым или непереносимым эффектам для проходящего лечение субъекта. Проходящий лечение пациент может, по выбору, получить другое средство лечения рака такое, как хирургическое вмешательство, радиационная терапия или химиотерапия, в зависимости от того, какое лечение, как установлено, приемлемо или переносимо.

Лечение аутоиммунных заболеваний

Конъюгаты Лиганд-Лекарство полезны для уничтожения или замедления размножения клетки, которая продуцирует аутоиммунное заболевание или для лечения аутоиммунного заболевания. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы таким образом в ряде методик для лечения аутоиммунного заболевания у пациента. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы, чтобы доставить лекарство к целевой клетке. Не ограничивая себя рамками какой-либо теории, авторы изобретения полагают, что в одном варианте реализации Конъюгат Лиганд-Лекарство ассоциируется с

антигеном на поверхности целевой клетки, и конъюгат Лиганд-Лекарство захватывается внутрь клетки мишени через опосредованный рецепторами эндоцитоз. Попад внутрь клетки, одна или более специфических последовательностей пептидов в пределах Линкерной группы отщепляются, приводя к высвобождению Лекарства или Лекарственной группы. Вышедшее Лекарство или Лекарственная группа затем становятся свободны, чтобы мигрировать в цитозоль и индуцировать цитотоксическую или цитостатическую активности. В альтернативных вариантах реализации Лекарство отщепляется от Конъюгата Лиганд-Лекарство снаружи целевой клетки, и Лекарство или Лекарственная группа впоследствии проникают в клетку.

В одном варианте реализации Лигандная группа связывается с аутоиммунным антигеном. В одном варианте антиген находится на поверхности клетки, вовлеченной в аутоиммунное состояние.

В другом варианте реализации Лигандная группа связывается с аутоиммунным антигеном, который находится на поверхности клетки.

В одном варианте реализации Лигандная группа связывается с активированными лимфоцитами, которые связаны с состоянием аутоиммунного заболевания.

В дополнительном варианте реализации Конъюгат Лиганд-Лекарство убивает или ингибирует размножение клеток, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциируемые с конкретным аутоиммунным заболеванием.

Особые типы аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить конъюгатами Лиганд-Лекарство, включают в себя, но не ограничиваются этим, нарушения, связанные с лимфоцитами Th2 (*например*, атопический дерматит, атопическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз, и болезнь «трансплантат против хозяина»); нарушения, связанные с лимфоцитами Th1 (*например*, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, базедова болезнь, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, и туберкулез); нарушения, активируемые В лимфоцитами (*например*, системная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит, и диабет типа I); и болезни, раскрытые в таблице 2.

Таблица 2

активный хронический гепатит, болезнь Аддисона, аллергический альвеолит, аллергическая реакция, Аллергический ринит, синдром Альпорта, анафилаксия, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, артрит, аскаридоз, аспергиллез, атопическая аллергия, эктопированный дерматит, эктопированный ринит, болезнь Бехчета, лёгочная аллергия птицеводов, бронхиальная астма, синдром Каплана,

кардиомиопатия, целиакия, болезнь Шагаса, Хронический гломерулонефрит, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, врожденная инфекционная краснуха, синдром CREST (мягкая форма склеродермии), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, дерматомиозит, дискоидная волчанка, синдром Дресслера, синдром Итона-Ламберта, эховирусная инфекция, энцефаломиелит, эндокринная офтальмопатия, вирусная инфекция Эпштейна-Барра, эквизема легких у лошадей, эритематоз, синдром Эвана, синдром Фелти, фибромиалгия, циклит Фукса, атрофия желудка, желудочно-кишечная аллергия, гигантоклеточный артерит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, болезнь «трансплантат против хозяина», базедова болезнь, болезнь Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Шенлейна-Геноха, идиопатическая атрофия коры надпочечников, идиопатический легочный фибрит, IgA нефропатия, воспалительные заболевания кишечника, инсулинозависимый сахарный диабет, ювенильный артрит, ювенильный сахарный диабет (Типа I), синдром Ламберта-Итона, ламинит, красный плоский лишай, волчаночный гепатит, волчанка, лимфопения, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, миастения гравис, пернициозная анемия, полигландулярные синдромы, болезнь Альцгеймера, первичная агаммаглобулинемия, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, привычный выкидыш, синдром Рейтера, ревматическая атака, Ревматоидный артрит, синдром Самптера, шистосомоз, синдром Шмидта, склеродермия, синдром Шульмана, синдром Шегрена, синдром Штиффмана, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка, артериит Такаясу, временны артериит, тиреоидит, тромбоцитопения, тиреотоксикоз, токсический эпидермальный некролиз, устойчивость к инсулину Типа В, сахарный диабет Типа I, язвенный колит, увеит, витилиго, макроглобулинемия Вальденстрема, гранулематоз Вегенера.

Полимедикаментозная терапия аутоиммунных заболеваний

Также раскрываются способы лечения аутоиммунного заболевания, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества Конъюгата Лиганд-Лекарство и других терапевтических средств, известных для лечения аутоиммунного заболевания.

Лечение инфекционных заболеваний

Конъюгаты Лиганд-Лекарство полезны для уничтожения или замедления размножения клетки, которая продуцирует инфекционное заболевание или для лечения инфекционного заболевания. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы, таким образом, в ряде случаев для лечения инфекционного заболевания у пациента. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть использованы, чтобы доставить лекарство к

целевой клетке. В одном варианте реализации Лигандная группа связывается с клеткой возбудителя инфекционного заболевания.

В одном варианте реализации конъюгаты убивают или замедляют размножение клеток, которые продуцируют то или иное инфекционное заболевание.

Конкретные типы инфекционных заболеваний, которые можно лечить конъюгатами Лиганд-Лекарство, включают в себя, но не ограничиваются этим, болезни, раскрытые в таблице 3.

Таблица 3

Бактериальные Заболевания:

дифтерия, коклюш, скрытая бактериемия, инфекция мочевыводящих путей, гастроэнтерит, целлюлит, эпиглоттит, трахеит, гипертрофия аденоидов, ретрофарингеальный абсцесс, импетиго, эктима, пневмония, эндокардит, септический артрит, пневмококковая инфекция, перитонит, бактериемия, менингит, острый гнойный менингит, уретрит, цервицит, проктит, фарингит, сальпингит, эпидидимит, гонорея, сифилис, листериоз, сибирская язва, нокардиоз, сальмонеллез, брюшной тиф, дизентерия, конъюнктивит, синусит, бруцеллез, туляремия, холера, бубонная чума, спазм, некротический энтерит, актиномикоз, комплексные анаэробные инфекции, сифилис, возвратный тиф, лептоспироз, болезнь Лайма, лихорадка от укуса крыс, туберкулез, лимфаденит, лепра (проказа), хламидиоз, хламидиальная пневмония, трахома, конъюнктивит с включениями (бленнорея)

Системные грибковые Заболевания:

гистоплазмоз, кокцидиодомикоз, бластомикоз, споротрихоз, криптококковая инфекция, системный кандидоз, аспергиллез, мукоромикоз, мицетома, хромомикоз

Риккетсиозные Заболевания:

тиф, пятнистая лихорадка Скалистых гор, эрлихиоз, восточный клещевой риккетсиоз, осповидный риккетсиоз, Q-риккетсиоз, бартонеллез

Паразитические Заболевания:

малярия, бабезиоз, африканский трипаносомоз, болезнь Шагаса, лейшманиоз, лихорадка дум-дум, токсоплазмоз, менингоэнцефалит, кератит, энтамебиаз, гиардоз (лямблиоз), криптоспоридиоз, изоспориоз, циклоспориоз, микроспоридиоз, аскаридоз, заражение власоглавом, анкилостомоз, заражение острицами, синдром блуждающей личинки (глазная форма), трихиноз, дракункулез, лимфатический филяриатоз, лоазоз, речная слепота (онхоцеркоз), собачий дирофиляриоз, шистосомоз, синдром пловца (аллергический кожный зуд), парагонимоз, восточный печеночный сосальщик, фасциолез, фасциолопсиоз, описторхоз, заражения ленточными червями, эхинококкоз, альвеолярный

ЭХИНОКОККОЗ

Вирусные Заболевания:

корь, подострый склерозирующий панэнцефалит, обычная простуда, свинка, коревая краснуха, розеола, инфекционная эритема, ветряная оспа, респираторно-синцитиальная вирусная инфекция, круп, капиллярный бронхит, инфекционный мононуклеоз, полиомиелит, герпетическая ангина, вирусная пузырьчатка конечностей и полости рта, бронхольмская болезнь, генитальный герпес, остроконечная кондилома, асептический менингит, миокардит, перикардит, гастроэнтерит, синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), синдром Рейе, синдром Кавасаки, грипп, бронхит, вирусная “блуждающая” пневмония, острое респираторное лихорадочное заболевание, острая фарингоконъюнктивальная лихорадка, эпидемический кератоконъюнктивит, вирус простого герпеса 1 (HSV-1), вирус простого герпеса 2 (HSV-2), опоясывающий лишай, цитомегаловирусная инфекция, бешенство, прогрессивная мультифокальная лейкоэнцефалопатия, куру, смертельная семейная бессонница, болезнь Кройцфельда-Якоба, болезнь Герстмана – Штраусслера - Шейнкера, тропический спастический парепарез, западный энцефалит лошадей, калифорнийский энцефалит, энцефалит Сент-Луис, амариллез, лихорадка денге, лимфоцитарный хориоменингит, лихорадка Ласса, геморрагическая лихорадка, хантавирусный легочный синдром, марбургская вирусная инфекция, вирусная инфекция Эбола, оспа.

Полимедикаментозная терапия инфекционных заболеваний

Также раскрываются способы лечения инфекционного заболевания, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, Конъюгата Лиганд-Лекарство и другого терапевтического средства, которое является антиинфекционным.

Композиции и способы введения

Настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие Конъюгаты Лиганд-Лекарство, описанные в этом документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть в любой форме, которая позволяет соединению быть введенным пациенту для лечения нарушения, ассоциируемого с экспрессией антигена, с которым связывается Лигандная группа. Например, конъюгаты могут быть в форме жидкости или твердого тела. Предпочтительным путем введения является парентеральный. Парентеральное введение включает в себя подкожную инъекцию, внутривенную, внутримышечную, интратермальную инъекцию или инфузии. В одном варианте композиции вводятся парентерально. В одном варианте соединения вводятся внутривенно.

Настоящее изобретение также предлагает фармацевтические композиции,

содержащие Конъюгаты Лиганд-Функциональное Средство, описанные в этом документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Конъюгаты Лиганд-Лекарство могут быть в любой форме, которая позволяет соединению быть введенным пациенту для лечения нарушения или для диагностических целей.

Фармацевтические композиции могут быть составлены так, чтобы позволять соединению быть биодоступным при введении композиции пациенту. Композиции могут принимать форму одной или более единиц дозирования, где, например, одна таблетка может быть отдельной единицей дозирования.

Материалы, использованные в изготовлении фармацевтических композиций, могут быть нетоксичными в используемых количествах. Рядовым специалистам в данной области будет очевидно, что оптимальная дозировка активного вещества (веществ) в фармацевтической композиции будет зависеть от ряда факторов. Относящиеся к делу факторы включают в себя, без ограничения, тип животного (*например*, человек), конкретную форму соединения, способ введения, и применяемую композицию.

Композиция может находиться, например, в форме жидкости. Жидкость может быть пригодной для доставки путем инъекции. В композицию для введения путем инъекции также могут быть включены один или более сурфактантов (ПАВ), консервантов, увлажняющих средств, диспергаторов, суспендирующих средств, буферов, стабилизаторов и изотонических средств.

Жидкие композиции, если они являются растворами, суспензиями или другими подобными формами, могут также включать в себя одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие, как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, жирные масла, такие, как синтетические моно или диглицериды, которые могут служить как растворитель или суспендирующая среда, полиэтилен гликоли, глицерин, циклодекстрин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, например, бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты такие, как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие, как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие, как аминокислоты, ацетаты, цитраты или фосфаты; детергенты, такие, как неионные сурфактанты, полиспирты; и средства для регулирования тоничности, такие, как хлорид натрия или декстроза. Композиция для парентерального введения может быть заключена в ампулу, одноразовый шприц или многодозовую тару, изготовленную из стекла, пластика или другого материала. Физиологический раствор является типичным адьювантом. Композиция для инъекций предпочтительно стерильна.

Количество конъюгата, которое эффективно в лечении того или иного

расстройства или состояния, будет зависеть от природы расстройства или состояния, и может быть определено стандартными клиническими методиками. Кроме того, могут по выбору быть задействованы анализы *in vitro* или *in vivo*, чтобы помочь идентифицировать оптимальные интервалы дозирования. Точная доза, работающая в композициях, будет также зависеть от способа введения, и тяжести заболевания или нарушения, и должна быть установлена согласно суждению практикующего специалиста и состоянию каждого пациента.

Композиции содержат эффективное количество соединения, такое, чтобы была получена приемлемая дозировка. Обычно это количество составляет по меньшей мере около 0,01% соединения от массы композиции.

Для внутривенного введения композиция может содержать от около 0,01 до около 100 мг Конъюгата Лиганд-Лекарство на кг массы тела животного. В одном варианте композиция может включать в себя от около 1 до около 100 мг Конъюгата Лиганд-Лекарство на кг массы тела животного. В другом варианте вводимое количество будет находиться в интервале от около 0,1 до около 25 мг/кг массы тела соединения.

В целом, доза соединения, вводимая пациенту, составляет обычно от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации доза, вводимая пациенту, находится между точками около 0,01 мг/кг и около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации доза, вводимая пациенту, находится между точками около 0,1 мг/кг и около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации доза, вводимая пациенту, находится между точками около 0,1 мг/кг и около 20 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации введенная дозировка находится между точками около 0,1 мг/кг и около 5 мг/кг или между около 0,1 мг/кг и около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации введенная дозировка находится между точками около 1 мг/кг и около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации введенная дозировка находится между точками около 1 мг/кг и около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации введенная дозировка находится между точками около 0,1 и 4 мг/кг, даже более предпочтительно между 0,1 и 3,2 мг/кг, или еще более предпочтительно между 0,1 и 2,7 мг/кг массы тела субъекта на протяжении курса лечения.

Конъюгаты Лиганд - Функциональное Средство, например конъюгаты Лиганд-Лекарство), могут быть введены любым обычным способом, например, вливанием или введением шарика, абсорбцией через эпителиальные или слизисто-кожные слизистые (например, слизистая ротовой полости, прямой кишки и желудочно-кишечная слизистая). Введение может быть системным или местным. Известны различные системы доставки,

например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, капсулы, и они могут быть использованы для того, чтобы ввести соединение. В некоторых вариантах реализации пациенту вводятся более чем одно соединение или композиция.

Термин “носитель” относится к разбавителю, адьюванту или наполнителю, с которым вводится соединение. Такие фармацевтические носители могут быть жидкостями, такими как вода и жидкие масла, включая таковые из нефтепродуктов, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, вазелиновое масло, сезамовое масло. Носителями могут быть солевой раствор, камедь акации, желатин, крахмальный клейстер, тальк, кератин, коллоидный кремний, мочевины. В дополнение, могут быть использованы вспомогательные средства, стабилизаторы, загустители, смазки и окрашивающие вещества. В одном варианте реализации вводимые пациенту соединения или композиции и фармацевтические приемлемые носители стерильны. Вода является типичным носителем, когда соединения вводятся внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут применяться как жидкие носители, особенно в растворах, пригодных для инъекций. Пригодные фармацевтические носители также включают в себя наполнители, такие как крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, вода, этиловый спирт. Настоящие композиции, по желанию, могут также содержать незначительные количества увлажняющих средств или эмульгаторов, или pH буферных веществ.

В одном варианте реализации конъюгаты составляются согласно рутинной процедуре как фармацевтическая композиция, адаптированная для внутривенного введения животным, особенно человеку. Обычно носители или средства доставки для внутривенного введения представляют собой стерильные изотонические водные буферные растворы. Когда необходимо, композиции могут также включать в себя средство, облегчающее растворение. Композиции для внутривенного введения могут по выбору содержать местный анестетик, например лигнокаин, чтобы облегчить боль в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются или по отдельности или смешаны вместе в форме единицы дозирования, например, как сухой лиофилизированный порошок или безводный концентрат в герметично запечатанном контейнере, например, в ампуле или саше, показывающем качество действующего вещества. Если конъюгат должен быть введен путем инфузии, он может быть дозирован, например, бутылкой для инфузий, содержащей стерильную воду фармацевтического качества или солевой раствор. Если конъюгат вводят путем инъекции, может использоваться ампула со стерильной водой для

инъекций или солевой раствор, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

Фармацевтические композиции в основном состояются как стерильные, практически изотонические и в полном согласии со всеми положениями надлежащей производственной практики (GMP) Управления по пищевым продуктам и лекарственным веществам США.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения содержат конъюгаты Лиганд-Лекарство настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах реализации все, или практически все, или более, чем 50% конъюгатов лиганд-лекарство, присутствующих в фармацевтической композиции, содержат гидролизованный тиазамещенный сукцинимид. В некоторых предпочтительных вариантах реализации более чем 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98%, или 99% конъюгатов лиганд – лекарство, присутствующих в фармацевтической композиции, содержат гидролизованный тиазамещенный сукцинимид.

Способы изготовления конъюгатов Лиганд-Лекарство

В другом варианте настоящее изобретение предлагает способы изготовления конъюгатов Лиганд-Лекарство или Конъюгатов Лиганд-Функциональное Средство, содержащих Самостабилизирующийся Линкер.

В некоторых вариантах реализации способы настоящего изобретения включают этапы получения Лекарство-Линкера или Линкерной группы, описанных в этом документе, конъюгирования упомянутых Лекарство-Линкера или Линкерной группы с сульфгидрильной группой Лигандной группы, чтобы образовать конъюгат, позволяя полученному в результате конъюгату подвергнуться реакции гидролиза, чтобы образовать Конъюгат Лиганд-Лекарство, содержащий тиазамещенный гидролизованный сукцинимид.

Скорость гидролиза тиазамещенного сукцинимиды может быть изменена путем регулирования условий реакции, следующей за конъюгацией Лекарство-Линкера с Лигандом, *например* регулированием pH или температуры. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения весь, в основном весь или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или даже 95% тиазамещенного сукцинимиды гидролизуются без манипуляций с условиями реакции, *т.е.* реакция гидролиза происходит при тех же самых условиях, что и реакция конъюгации. В некоторых вариантах реализации весь, в основном весь или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или даже 95% тиазамещенного сукцинимиды гидролизуются от 20 минут до 4 часов после конъюгации, предпочтительно от 20 минут до 2 часов после конъюгации. В типичных вариантах реализации условия

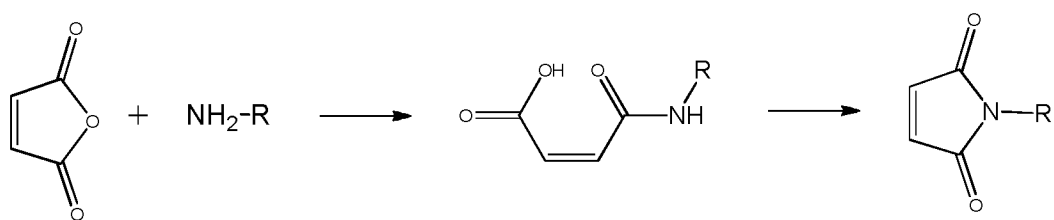
конъюгации таковы: рН около 7,4 и температура около 22°C.

В некоторых вариантах реализации способы изготовления Конъюгата Лиганд-Лекарство включают этапы предоставления Лекарство-Линкера или Линкерной группы, содержащих Самостабилизирующийся Линкер; конъюгирования упомянутых Лекарства-Линкера или Линкерной группы с сульфгидрильной группой Лигандом, чтобы образовать Конъюгат Лиганд-Лекарство, содержащий негидролизованный тиозамещенный сукцинимид; позволяя негидролизованному тиозамещенному сукцинимиду подвергнуться реакции гидролиза, в которой весь, в основном весь или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или даже 85% сукцинимид гидролизуется от 10 минут до 4 часов после конъюгации. В некоторых вариантах реализации весь, в основном весь или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или даже 95% сукцинимид гидролизуется за 10 минут, за 20 минут, 40 минут, 60 минут, 90 минут или 120 минут после конъюгации. В некоторых вариантах реализации реакция гидролиза протекает в тех же самых условиях, что и реакция конъюгации. В типичных вариантах реализации условия конъюгации таковы: рН около 7,4 и температура около 22°C.

Способы Синтеза Самостабилизирующихся Линкеров

Настоящее изобретение предлагает, *в частности*, Самостабилизирующиеся Линкеры. Способы изготовления Самостабилизирующихся Линкерных групп также охватываются настоящим изобретением.

Малеимидные соединения получают из соответствующих аминов реакцией первичного амина с малеиновой кислотой, за которой следует циклодегидратация малеиновой кислоты. Общая схема получения малеимидных соединений показана на схеме ниже.



Для получения малеимидов, содержащих основные группы в боковой цепи начального амина, такие основные группы следует при необходимости защитить. Подходящие защитные группы должны быть стабильны в условиях получения малеимидов, еще они должны быть способны к удалению позже в присутствии малеимида. Пригодные защитные группы включают, но не ограничиваются этим, кислотолабильные защитные группы. “Трет-бутоксикарбонильная” защитная группа - одна из наиболее предпочтительных защитных групп.

Первый этап получения малеимида, образование малеиновой кислоты, очень

легкий и может обычно осуществляться с высоким выходом при медленном добавлении амина к суспензии, содержащей стехиометрический избыток малеинового ангидрида.

Второй этап, циклодегидратация малеиновой кислоты, может быть осуществлен множеством способов, известных специалистам в данной области. Например, использование химических обезвоживающих средств является хорошо известным способом для осуществления этого этапа. Карбодиимиды в сочетании с изомеризирующими спиртами, например дициклогексилкарбодиимид (DCC)/гидроксibenзотриазолом (HOBT), используются, чтобы вызвать циклодегидратацию аминокислоты до малеимидов.

Термическая циклодегидратация с использованием азеотропной перегонки в присутствии кислого катализатора является другим хорошо известным способом создания малеимидов. Использование азеотропного растворителя позволяет эффективно удалять водные побочные продукты по мере их образования, тем самым направляя реакцию к малеимиду. Подходящие азеотропные растворители включают в себя циклогексан, бензол, толуол, этилбензол, мезителен и т. п. Толуол рассматривается как наиболее желательный, так как он закипает при 110°C при атмосферном давлении. Температуры кипения ниже 200°C предпочтительны, чтобы минимизировать возможную термическую изомеризацию малеиновой кислоты до более термодинамически стабильной структуры транс (фумарамовой кислоты).

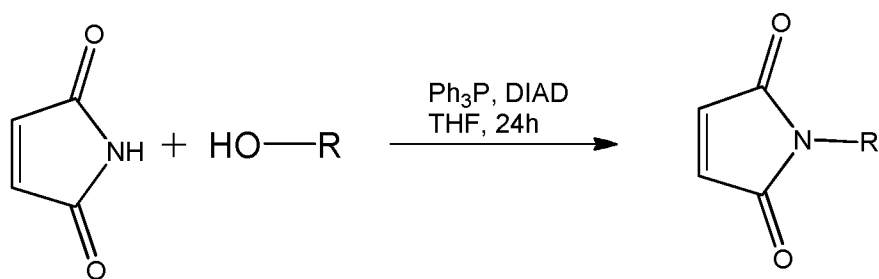
Использование полярных апротонных сорастворителей может быть полезно для улучшения общего выхода, а также сокращения времени циклодегидратации. Некоторые полярные апротонные растворители, включающие диметилформамид, диметилацетамид, ацетонитрил, N-метилпирролидон, диметилсульфоксид, и сульфат заявляются как пригодные. Наиболее подходящим полярным апротонным растворителем является диметилформамид.

Введение некоторых аминных солей вместо апротонных растворителей может быть особенно благоприятным для образования малеимида согласно Патенту США 5 973 166.

Также сообщалось о синтезе малеимида в один этап с использованием микроволн, начиная с малеинового ангидрида и соответствующего амина, без использования растворителя (H. N. Borah, et al., J. Chem. Research (S), 1998, 272-272).

Пример использования воды как растворителя для образования малеимида приведен в ARKIVOC, 2001 (v) 60-67 by V. Ondrus, et al.

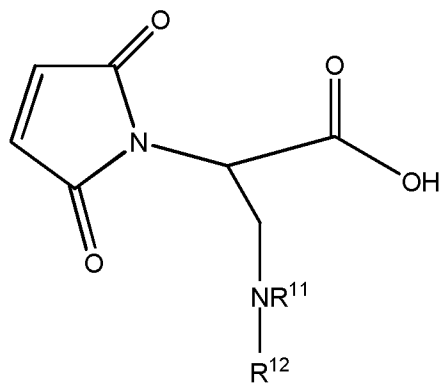
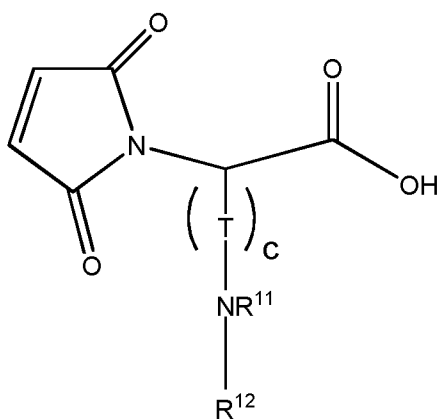
В качестве альтернативного варианта, малеимидные соединения могут быть образованы из малеимида и подходящего спирта с использованием, например, условий реакции Мицунобу, как показано на схеме ниже (M.A. Walker, Tetrahedron Letters, 1994, v. 35, n 5, pp. 665-668).



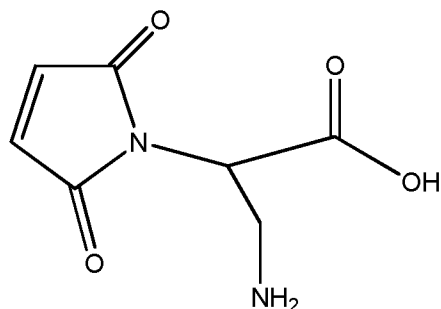
Самостабилизирующая линкерная область настоящего изобретения связывается с Расширителем, Отщепляемой группой, Разделителем, или Лекарственной группой, при использовании сведений, описанных в этом документе, в сочетании с методами, известными в данной области техники. Линкеры и Лекарство-Линкеры конъюгируют с Лигандными группами, используя сведения, описанные в этом документе, в сочетании с методами, известными в данной области техники. Например, для конъюгации с межцепочечными дисульфидами, антитело может быть обработано восстановителем, таким, как дитиотреитол, (DTT) чтобы восстановить некоторые или все межцепочечные дисульфидные цистеиновые остатки, чтобы образовать высоконуклеофильные цистеиновые тиольные группы. Полностью восстановленное антитело или частично восстановленное антитело может быть впоследствии сконъюгировано с малеимидом Линкерной группы. В типичных вариантах реализации условия конъюгации мягкие: pH около 7 и температура около 22°C.

Интермедиаты

Настоящее изобретение описывает интермедиаты для использования в изготовлении Самостабилизирующихся Линкеров. Интермедиаты включают в себя следующие, где T, c, R¹¹ и R¹² - как описано ранее.



и

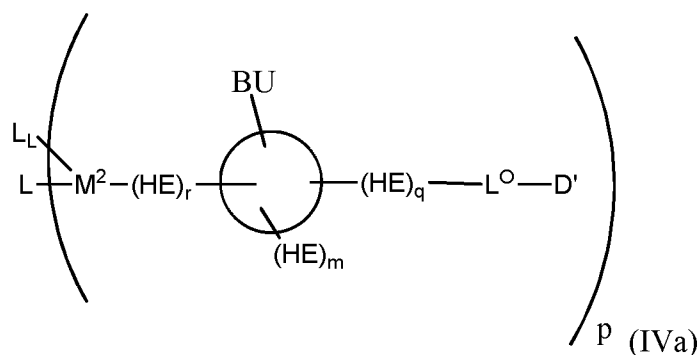
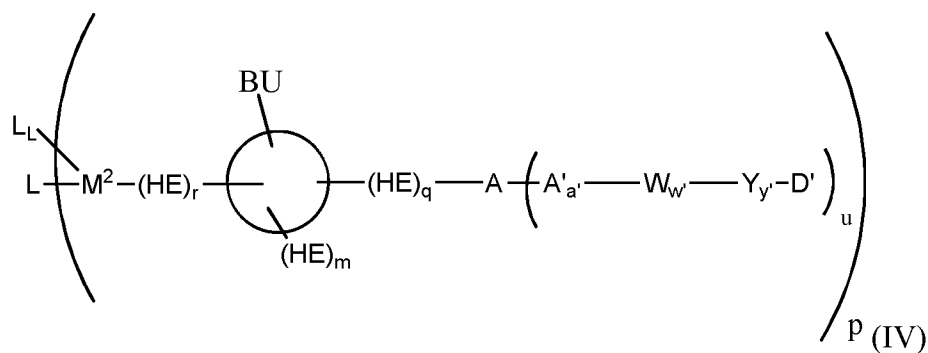


Моно-тиозамещенные или ди-тиозамещенные малеимидные или сукцинимидные Самостабилизирующиеся Линкеры

В дополнение к конструированию Самостабилизирующихся Линкеров для повышения скорости гидролиза моно-тиозамещенных сукцинимидов, Самостабилизирующиеся Линкеры могут также быть использованы для того, чтобы повысить скорость гидролиза моно-тиозамещенных малеимидов, ди-тиозамещенных малеимидов, или ди-тиозамещенных сукцинимидов.

На основании вышеизложенного, настоящее изобретение предлагает в одной группе вариантов реализации Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство, содержащий Лигандную группу и по меньшей мере одно Функциональное Средство, выбранное из лекарственной группы, Метки, или Стабилизатора, в котором Лигандная группа и каждое из Функциональных Средств соединены самостабилизирующейся линкерной областью, содержащей сукцинимидное кольцо, малеимидное кольцо, гидролизованное сукцинимидное кольцо или гидролизованное малеимидное кольцо, в которой сукцинимидное кольцо, малеимидное кольцо, гидролизованное сукцинимидное кольцо или гидролизованное малеимидное кольцо непосредственно присоединено к Лигандной группе через одну или две простые тиоэфирные связи; и основание и электроноакцепторная группа функционально связаны, чтобы стабилизировать конъюгат в плазме по отношению к Конъюгату Лиганд-Функциональное Средство, не имеющему самостабилизирующейся линкерной области (т.е. путем повышения скорости гидролиза сукцинимидного или малеимидного кольца). В некоторых вариантах электроноакцепторная группа замещена так, чтобы повысить электрофильность сукцинимида или малеимида, делая его более способным к реакции с водой, и основание расположено, чтобы способствовать гидролизу сукцинимида или малеимидного кольца (например, по механизму внутримолекулярного основного катализа).

В некоторых вариантах реализации Конъюгаты Лиганд-Функциональное Средство представлены Формулой IV или IVa:



или их солью (например, их фармацевтически приемлемой солью);

где

L - Лигандная группа

L_L - Лигандная группа, которая может присутствовать или отсутствовать, где L и L_L может быть теми же самыми или другими Лигандными группами;

D' - Лекарственная группа, Метка или Стабилизатор;

L^O - необязательная вторичная линкерная область;

M^2 малеимидное кольцо, гидролизированный малеимид, сукцинимидное кольцо, или гидролизированный сукцинимид сконъюгирован с по меньшей мере одним из L или L_L простой тиоэфирной связью; и

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

Круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к L^O , A, W, Y или D' ;

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма $m + q + r$ равна 0, 1 или 2 при условии, что если $m + q + r$ равен 0, остов представляет собой C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарилен;

индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20;

-W- - необязательная Отщепляемая группа,

индекс w' равен 0 или 1;

-Y- - необязательная Разделительная группа,

индекс y' равен 0 или 1,

-A- - необязательный Расширитель,

-A'- - необязательный компонент Расширителя на конце A;

a' равен 0 или 1; и

u равен от 1 до 20, при условии, что когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать.

L, HE и BU, L^O , A, W, и Y имеют значения, предоставленные для конъюгатов Лиганд-Лекарство. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для круга, L, HE, BU, L^O , A, W, и Y в равной степени применим к этим Конъюгатам. L и L_L могут быть другими Лигандными группами или той же самой Лигандной группой. В вариантах реализации в которых L и L_L являются той же самой Лигандной группой, сукцинимид или малеимид может быть сконъюгирован с Лигандной группой на той же или другой полипептидных цепях Лигандной группы.

В некоторых вариантах, когда r равен 1, HE не содержит карбонильную группу, (т.е., $C(=O)$)

В некоторых вариантах $m + q + r$ равен 0, 1 или 2

В некоторых вариантах r равен нулю.

В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой IV или IVa или их солью, где r и m равны нулю и q равен единице.

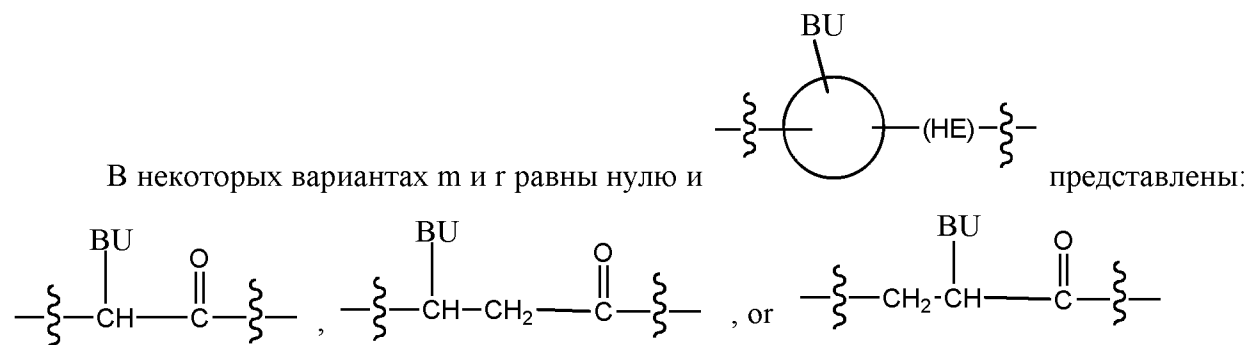
В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой IV или IVa или его солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен), r равен нулю, и сумма $m+q$ равна 1. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.

В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой IV или IVa или его солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C_{1-8} алкилен или C_{1-8} гетероалкилен (предпочтительно C_{1-4} алкилен или C_{1-4} гетероалкилен), и m и r равны нулю. В некоторых таких вариантах остов представляет собой C_{1-3} алкилен или C_{1-3} гетероалкилен. В некоторых таких вариантах алкилен имеет прямую или разветвленную цепь.

В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой IV или IVa или его солью, в которой круг обозначает остов, который

представляет собой C₁, C₂, C₃ или C₄ алкилен с прямой или разветвленной цепью, r равен нулю, и сумма m+q равна 1.

В некоторых вариантах Конъюгат Лиганд-Функциональное Средство представлен Формулой IV или IVa или его солью, в которой круг обозначает остов, который представляет собой C₁, C₂, C₃ или C₄ алкилен с прямой или разветвленной цепью, и m и r равны нулю.



В некоторых вариантах имеется не менее, чем 2 и не более, чем 6 промежуточных атомов между основанием Основной группы и атомом азота малеимида или сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного) и имеется не более, чем 5 атомов, не более, чем 4 атома, не более, чем 3 атома, или не более, чем 2 промежуточных атома между электроноакцепторной группой и атомом азота малеимида или сукцинимид (гидролизованного или негидролизованного).

В некоторых вариантах M² - это сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид, и L_L присутствует. В некоторых вариантах M² - это сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид, и L_L отсутствует. В некоторых вариантах M² - это малеимидное кольцо или гидролизированный малеимид, и L_L присутствует. В некоторых вариантах M² - это малеимидное кольцо или гидролизированный малеимид, и L_L отсутствует. В некоторых вариантах, когда M² - малеимидное кольцо или гидролизированный малеимид, L_L присутствует или отсутствует, а когда M² - сукцинимидное кольцо или гидролизированный сукцинимид, L_L присутствует. В каждом из этих вариантов реализации, когда L и L_L присутствуют, L и L_L может быть той же Лигандной группой или другими Лигандными группами. В некоторых вариантах, где L и L_L присутствуют и являются такой же Лигандной группой, малеимид или сукцинимид может быть сконъюгирован с Лигандной группой на той же или другой полипептидных цепях Лигандной группы.

В каждом из этих вариантов реализации алкиленовая или гетероалкиленовая цепь может быть прямой или разветвленной. В некоторых вариантах алкиленовая или гетероалкиленовая цепь будет прямой цепью. В других вариантах она будет

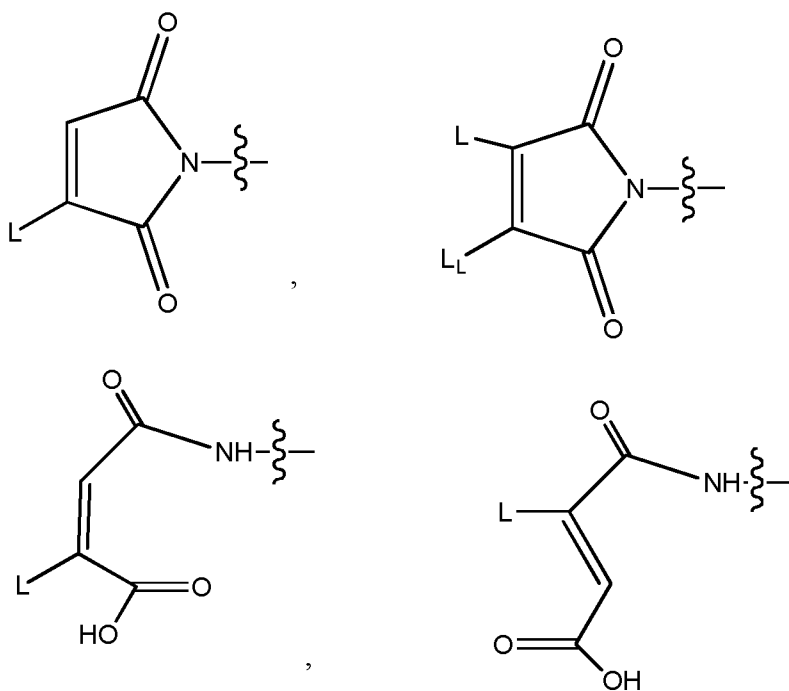
разветвленной.

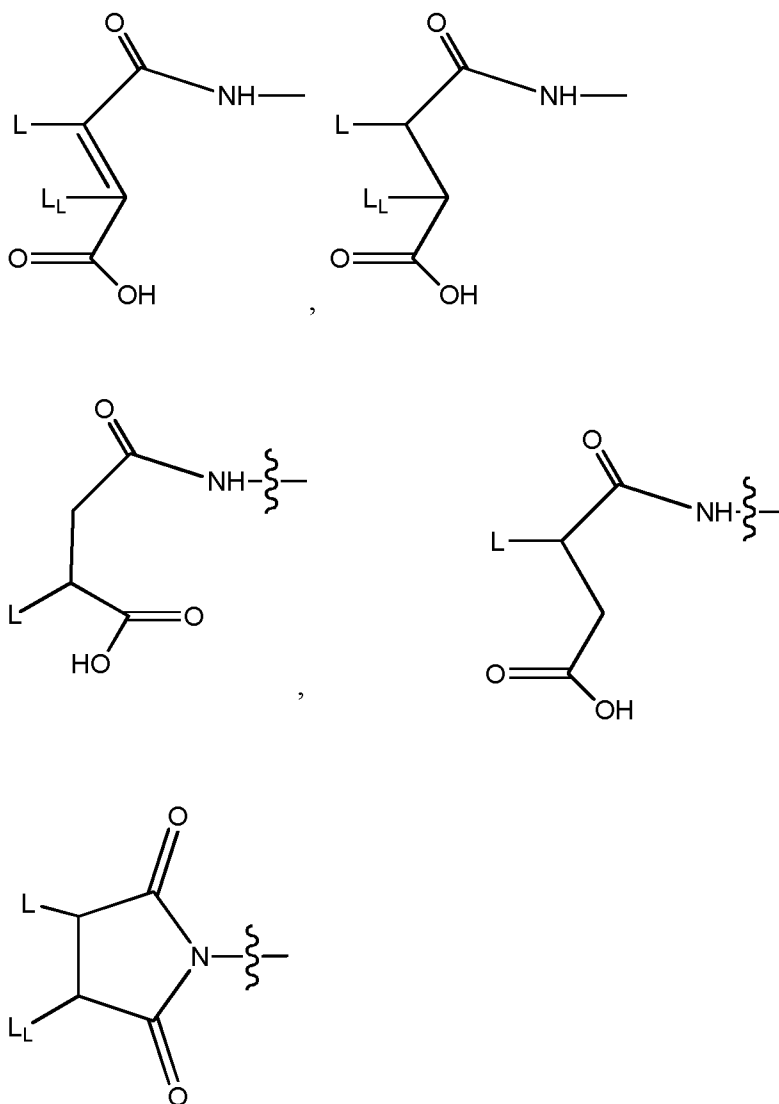
В каждом из этих вариантов реализации p может варьироваться от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12, даже более 1 до 10 или 1 до 8.

В некоторых вариантах, в которых остов сам непосредственно присоединен к необязательной вторичной линкерной области или D' , (например, в отдельных вариантах реализации когда q равен нулю или когда q равен нулю и r равен нулю), остов будет содержать реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к необязательной вторичной линкерной области или D' .

В некоторых вариантах, в которых остов сам непосредственно присоединен к необязательной вторичной линкерной области или D' , (например, в отдельных вариантах реализации когда q равен нулю или когда q равен нулю и r равен нулю), остов будет содержать реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к A или D' .

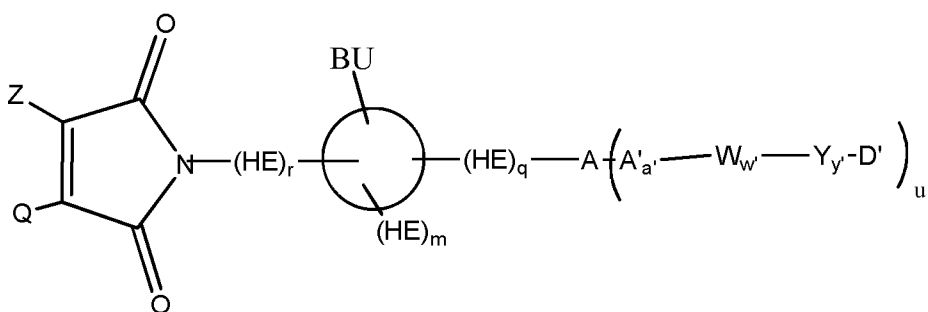
Малеимидное кольцо может быть сконъюгировано с Лигандной группой через одну или две простые тиоэфирные связи, как проиллюстрировано ниже как для негидролизованной, так и для гидролизованной формы, и сукцинимидное кольцо может быть сконъюгировано с Лигандной группой через две простые тиоэфирные связи, как проиллюстрировано ниже как для негидролизованной, так и для гидролизованной формы, где волнистая линия показывает точку присоединения к остатку линкерного конъюгата или конъюгата линкер-функциональное средство:

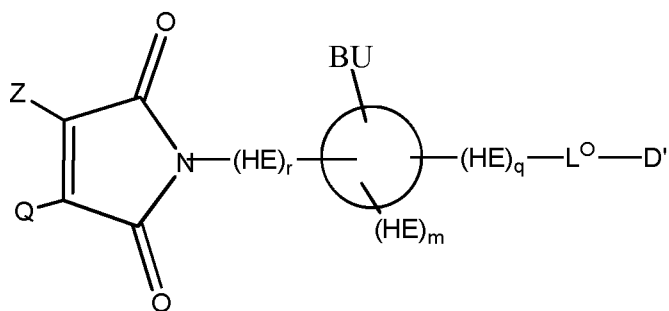




В вариантах реализации, в которых малеимидное кольцо, гидролизированный малеимид, сукцинимидное кольцо, или гидролизированный сукцинимид сконъюгированы с Лигандом через две простые тиоэфирные связи, r обычно находится в интервале от 1 до 10, или от 1 до 8, или от 1 до 4, и малеимид или сукцинимид могут быть сконъюгированы с той же самой или другими полипептидными цепями Лиганда. В некоторых вариантах Лиганд является антителом. В других вариантах Лиганд является белком, но не антителом.

Конъюгаты Линкер-Функциональное средство, содержащие линкеры или с прямой, или с разветвленной цепью, могут быть представлены следующими формулами:





или его солью (например, его фармацевтически приемлемой солью);

где

D' - Лекарственная группа, Метка или Стабилизатор;

L^O - необязательная вторичная линкерная область;

Q и Z являются водородом или галогеном, при этом по меньшей мере один из Q и Z является галогеном;

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к L^O, A, W, Y или D';

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма m + q + r равна 0, 1 или 2, при условии, что если m + q + r равен 0, остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарил;

W - необязательная Отщепляемая группа,

индекс w' равен 0 или 1;

-Y - необязательная Разделительная группа,

индекс y' равен 0 или 1,

A - необязательный Расширитель,

A' - необязательный компонент Расширителя на конце A;

a' равен 0 или 1; и

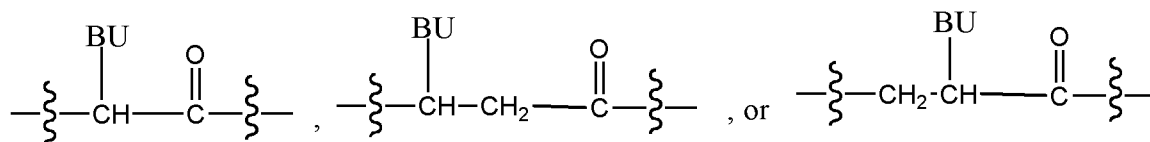
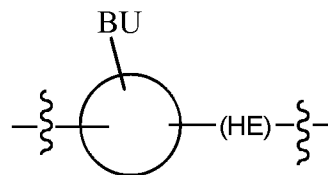
и равен от 1 до 20, при условии, что когда и равен от 2 до 20, A присутствует, и когда и равен 1, A может присутствовать или отсутствовать

В некоторых вариантах галоген является бромом.

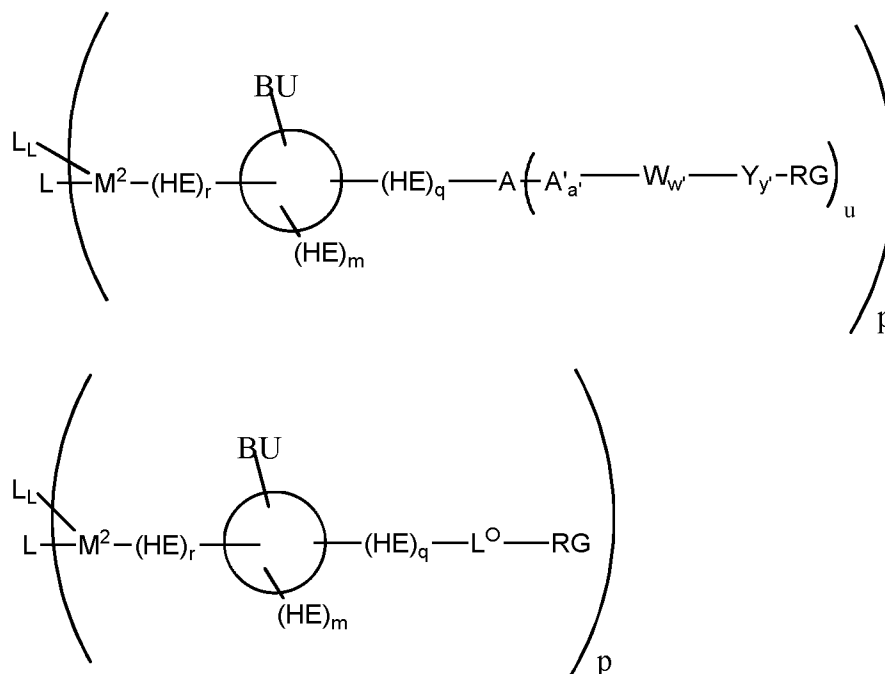
HE и BU, L^O, A, W, и Y имеют значения, представленные для Конъюгатов Лекарство-Линкер. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для круга, HE, BU, L^O, A, W, и Y в равной степени применим к этим

Конъюгатам.

В некоторых вариантах m и r равны нулю и представлен как:



Конъюгаты Лиганд – Линкер, содержащие либо разветвленный, либо неразветвленный линкеры, могут быть представлены следующими формулами:



или их солью (например, их фармацевтически приемлемой солью);

где

L - Лигандная группа;

L_L - Лигандная группа, которая может присутствовать или отсутствовать, где L и L_L может быть теми же самыми или другими Лигандными группами;

RG - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на конце L^O или $-\zeta-A-A_a-W_w-Y_y-\zeta-$, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы, Метки или Стабилизатора;

L^O - необязательная вторичная линкерная область, которая присутствует;

M^2 малеимидное кольцо, гидролизированный малеимид, сукцинимидное кольцо, или

гидролизированный сукцинимид, сконъюгированный с по меньшей мере одним из L или L_L простой тиоэфирной связью; и

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

круг обозначает остов, которым может быть C₁₋₈ алкилен, C₁₋₈ гетероалкилен, C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к L^O, A, W, Y или FA;

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма m + q + r равна 0, 1 или 2, при условии, что если m + q + r равен 0, остов представляет собой C₆₋₁₀ арилен или C₄₋₁₀ гетероарилен;

индекс p лежит в диапазоне от 1 до 20.

W- - необязательная Отщепляемая группа,

индекс w' равен 0 или 1;

-Y- - необязательная Разделительная группа,

индекс y' равен 0 или 1,

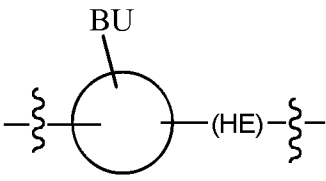
A - необязательный Расширитель,

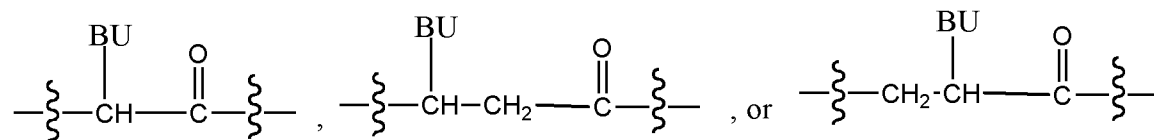
A' - необязательный компонент Расширителя на конце A;

a' равен 0 или 1; и

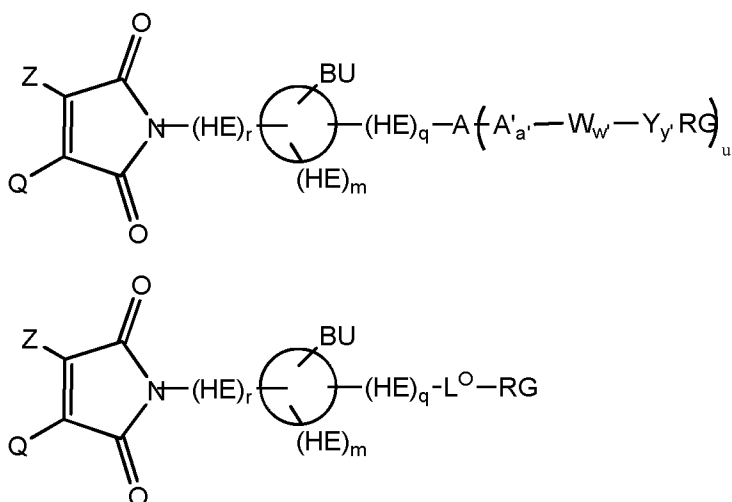
и равен от 1 до 20, при условии, что когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать.

L, HE и BU, L^O, A, W, и Y имеют значения, предоставленные для конъюгатов Лиганд-Лекарство. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для круга, L, HE, BU, L^O, A, W, и Y в равной степени применим к этим Конъюгатам.

В некоторых вариантах r и m равны нулю и  представлен как:



Разветвленные или неразветвленные Линкеры могут быть представлены следующими формулами:



или их соль (например, их фармацевтически приемлемой солью);

где

RG - реакционноспособная группа (содержащая реакционноспособный участок) на

конце L^O или $\xi-A-A_a'-W_w-Y_{y'}-\xi$, которая пригодна для присоединения Лекарственной группы, Метки или Стабилизатора;

L^O - необязательная вторичная линкерная область, которая присутствует;

Q и Z являются водородом или галогеном, при этом по меньшей мере один из Q и Z является галогеном;

BU - Основная группа;

HE - усилитель гидролиза, содержащий электроноакцепторную группу;

круг обозначает остов, которым может быть C_{1-8} алкилен, C_{1-8} гетероалкилен, C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарил, и необязательно содержит реакционноспособный участок, пригодный для присоединения к L^O , A, W, Y или RG;

индексы m, q и r каждый равны 0 или 1, и сумма $m + q + r$ равна 0, 1 или 2 при условии, что если $m + q + r$ равен 0, остов представляет собой C_{6-10} арилен или C_{4-10} гетероарил;

W- - необязательная Отщепляемая группа,

индекс w' равен 0 или 1;

-Y- - необязательная Разделительная группа,

индекс y' равен 0 или 1,

A - необязательный Расширитель,

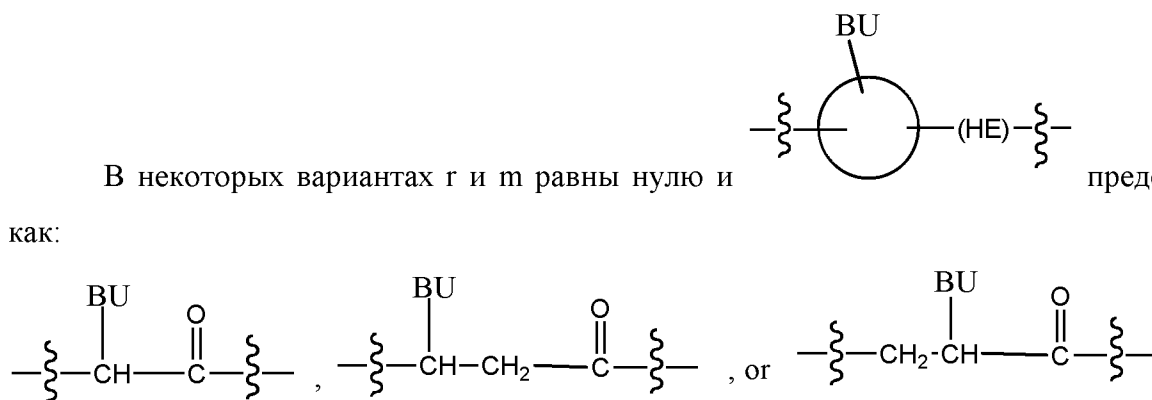
A' - необязательный компонент Расширителя на конце A;

a' равен 0 или 1; и

u равен от 1 до 20, при условии, что когда u равен от 2 до 20, A присутствует, и когда u равен 1, A может присутствовать или отсутствовать.

HE и BU, L^o, A, W, и Y имеют значения, предоставленные для конъюгатов Лиганд-Лекарство. Кроме того, каждый из конкретно перечисленных отдельных вариантов реализации для круга, HE, BU, L^o, A, W, и Y в равной степени применим к этим Конъюгатам.

В некоторых вариантах г и m равны нулю и представлен как:

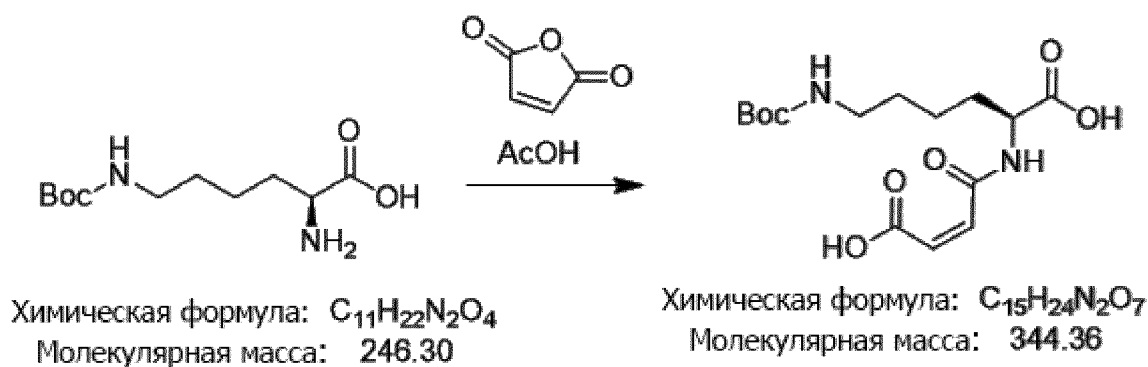


Способы изготовления моно- или дитиозамещенных галомалеимидов, а также дитиозамещенных сукцинимидов известны в данной области техники, поскольку они являются способами конъюгирования их с лигандами, см., например, Ryan et al., *Chem. Commun.*, 2011, 47, 5452-5454 и Smith et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132(6), 1960-1965.

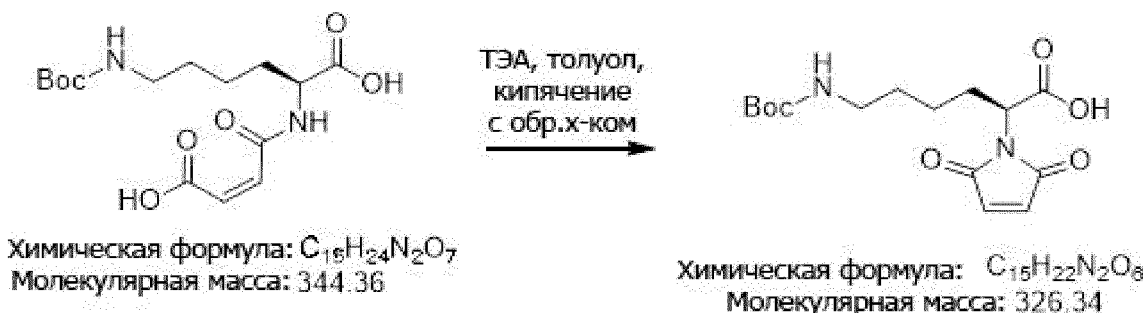
Примеры

Пример 1 – Синтез типичных Самостабилизирующихся Компонентов

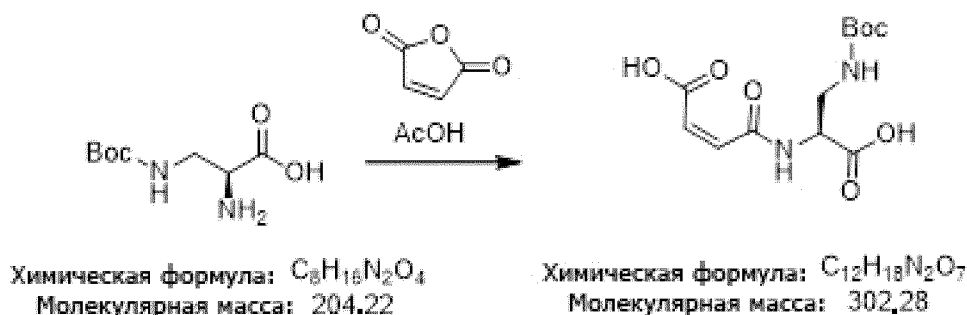
Малеил-Лизин(boc)ОН



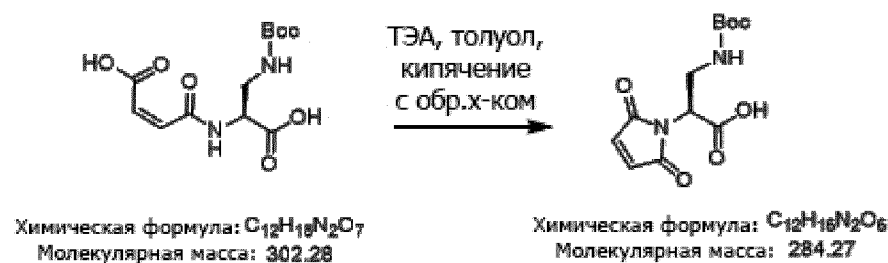
В круглодонной колбе объемом 50 мл Н-Лиз(boc)-ОН (246 мг, 1 ммоль) и малеиновый ангидрид (98 мг, 1 ммоль) растворяли в 1 мл (4 об.) уксусной кислоты и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь концентрировали до масла на роторном испарителе, и продукт осаждали добавлением ~ 10 мл дихлорметана. Преципитат собирали путем вакуумной фильтрации, промывали дихлорметаном, и в течение ночи сушили в вакуумной печи. Было извлечено 270 мг продукта в виде белого порошка (выход 85%).

Малеил-Лизин(бос)-ОН

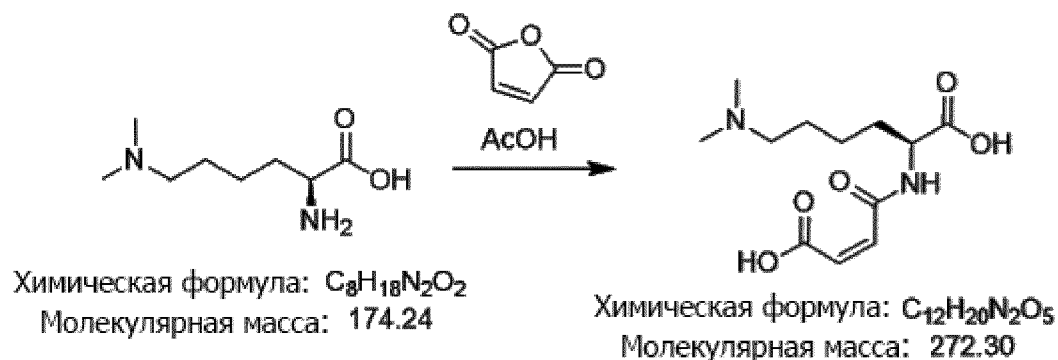
Малеил-Лиз(бос)-ОН (100 мг, 0.29 ммоль) суспендировали в Тoluоле (3 мл) и триэтиламине (224 мкл) над молекулярными сетками в круглодонной колбе объемом 50 мл, оснащенной холодильником. ДМА (~150 мкл) добавляли для облегчения растворения. Раствор нагревали до 125°C и кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов, после которых реакция завершилась, как было показано методом ЖХ/МС. Реакционную смесь концентрировали до сухости на роторном испарителе, перерастворяли в ДМСО и очищали подготовительной ВЭЖХ. 56 мг продукта было изолировано в виде белого порошка (выход 60%)

Малеил-DPR(бос)ОН

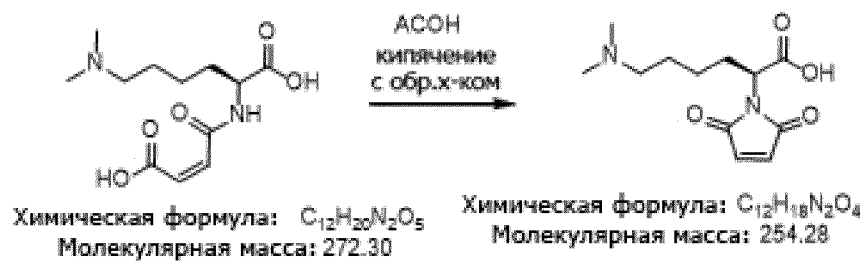
Малеил-DPR(бос)-ОН готовили таким же образом, как и Малеил-Лизин(бос)ОН. (503 мг, 67%)

Малеил-DPR(бос)-ОН

Малеил-DPR(бос)-ОН готовили таким же образом, как и Малеил-Лиз(бос). (340 мг, 71%)

Малеил-Диметиллизин

Малеил-диметиллизин готовили таким же образом, как и Малеил-Лиз(вос)-ОН, за исключением того, что продукт не осаждали после добавления дихлорметана. Вместо масла применяли совместное выпаривание 1:1 дихлорметаном/гексаном до получения белой пены и сушили под сильным вакуумом в течение ночи. (109 мг, 99%)

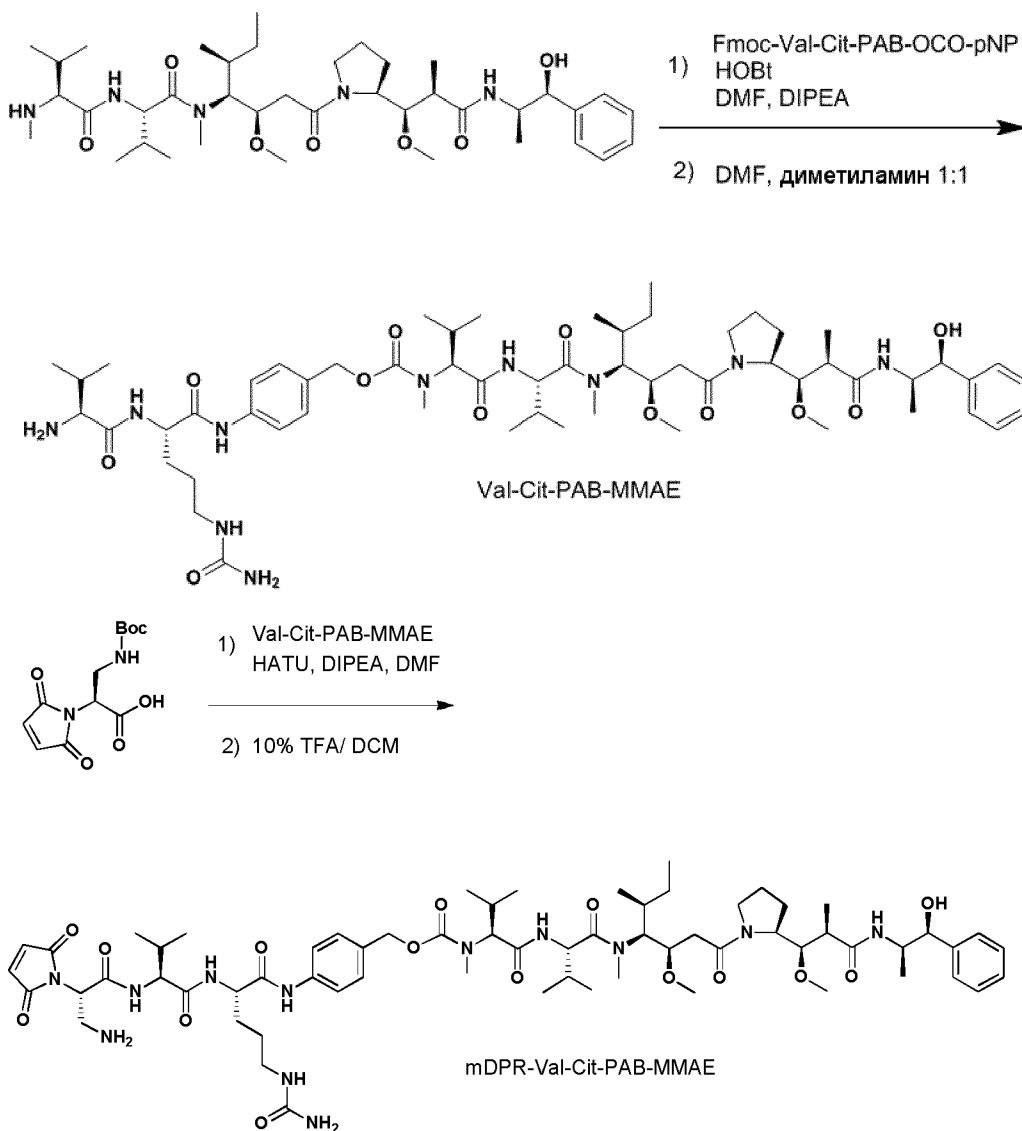
Малеил-диметиллизин

В круглодонной колбе объемом 10 мл Малеил-диметиллизин (100 мг) растворяли в уксусной кислоте (1 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов. После 4 часов реакцию смесь концентрировали до сухости на роторном испарителе и сушили до белой пены под сильным вакуумом. ЯМР неочищенного материала показывает ~80% превращения, основываясь на отношении синглета при 6,9 ч./млн и олефиновых протонов из исходного материала.

Пример 2 – Синтез mDPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

mDPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ получали путем присоединения Вос-защищенного mDPR к Вал-Цит-РАВ-ММАЕ, используя стандартные способы соединения пептидов. Группу Вос удалили на конечном этапе.

Схема:



Получение Fmoc-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

ММАЕ (5,34 г, 6,94 ммоль), Fmoc-Вал-Цит-РАВ-ОСО-pNP (5,0 г, 6,94 ммоль) и гидроксизотриазол (1,4 ммоль) помещали в круглодонную колбу объемом 250 мл, очищенную N₂ и растворяли в 15 мл ДМА. Затем добавляли ДИПЭА (2,44 мл, 14 ммоль), и раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в инертной атмосфере. Продукт изолировали подготовительной ВЭЖХ, используя градиентный режим, из 30% MeCN (0,05% ТФУК) до 100% MeCN (0,05% ТФУК) в течение 40 мин. Фракции, содержащие продукт, концентрировали на роторном испарителе до белого порошка, получая в результате 3,2 г (34%).

Получение Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

Раствор из 3,2 г Fmoc-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ в 7 мл ДМФА и 7 мл диэтиламина перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь затем концентрировали до густого масла на роторном испарителе. Продукт осаждали в

диэтиловом эфире (100 мл) и фильтровали, получая в результате 2,0 г продукта в виде грязно-белого порошка, который использовали без дополнительной очистки.

Получение mDPR (bos)Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

В круглодонной колбе объемом 50 мл mDPR(bos)-ОН (25 мг, 0,089 ммоль), Вал-Цит-РАВ-ММАЕ (100 мг, 0,089 ммоль), и НАТУ (41 мг, 0,107 ммоль) растворяли в 2 мл ДМФА. Добавляли ДИПЭА (34 мкл) и раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли 1 мл ДМСО и продукт изолировали подготовительной ВЭЖХ. (70 мг, 56%)

Получение mDPR -Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

Вышеописанный материал растворяли в 2 мл 10% ТФУК/дихлорметана и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали до сухости, восстанавливали в 1 мл ДМСО, и очищали подготовительной ВЭЖХ. (56 мг, 86%)

Пример 3 – Мониторинг гидролиза тиосукцинимиды

Гидролиз тиосукцинимиды самостабилизирующегося биоконъюгата можно отслеживать при помощи электрораспылительной масс-спектрометрии, так как добавление воды к конъюгату приводит к повышению на 18 Да наблюдаемой молекулярной массы конъюгата. Когда конъюгат получали путем полного восстановления межцепочечных дисульфидов человеческого антитела IgG1 и конъюгирования малеимида с образующимися в результате цистеинами, каждая легкая цепь антитела будет содержать одну модификацию малеимида, и каждая тяжелая цепь будет содержать три модификации малеимида (см. Фигура 1, сверху). Под действием полного гидролиза образующихся в результате тиосукцинимидов, масса легкой цепи будет, следовательно, повышаться на 18 Да, тогда как масса тяжелой цепи будет повышаться на 54 Да. Это проиллюстрировано на Фигуре 1 (внизу), конъюгацией и последующим гидролизом самостабилизирующегося малеимидного лекарство-линкера настоящего изобретения (mDPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ, молекулярная масса 1289 Да) до полностью восстановленного анти-CD30 антитела сAC10. Присутствие одного N-связанного сайта гликозилирования на тяжелой цепи приводит к неоднородности масс, наблюдаемой у некоъюгированного антитела.

Пример 4 – Мониторинг периода полугидролиза

Путем мониторинга интенсивности негидролизированных и гидролизированных пиков в масс-спектре самостабилизирующегося биоконъюгата в течение времени (mDPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ), может быть оценена кинетика гидролиза. Это делается путем построения графика зависимости процента общей популяции, гидролизовавшейся в

каждый момент времени, в зависимости от времени (Фигура 2, сверху). Эти данные затем аппроксимируются экспоненциальным уравнением

$$Y = Y_{\max} \times (1 - e^{(-Kt)})$$

где Y - наблюдаемый процент гидролиза в момент времени t , $Y_{\max}$ - асимптотический максимальный % гидролиза, и K - постоянный процент гидролиза. Полупериод для реакции гидролиза определен как

$$t_{1/2} = \ln(2) / K$$

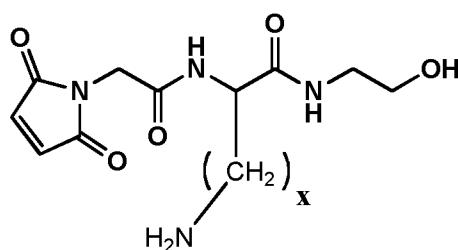
Когда эту процедуру осуществляют на легкой цепи восстановленного антитела hIgG1, анализ абсолютно прост, потому что имеется только один сайт конъюгации на легкую цепь и реакция является простой последовательностью перехода от негидролизованного вида к гидролизованному с изменением массы на 18 Дальтон. Осуществление этого анализа на тяжелой цепи осложняется из-за того, что всего имеется три сайта конъюгации, что приводит к появлению серии пиков из +18, +36, и +54 Дальтон по мере того, как конъюгат подвергается гидролизу. Анализ тяжелой цепи дополнительно осложняется присутствием нескольких гликоформ. Анализ, представленный на Фигуре 2, осуществляли путем оценки только пиков, возникающих от наиболее обильной гликоформы (переход от 54195 Да до 54250 Да) и предполагая, что эти пики являются приемлемым заменителем всей популяции гликоформ тяжелой цепи. Как очевидно из Фигуры 2, наблюдаемые профили кинетики для легкой и тяжелой цепей очень похожи. По этой причине, и вследствие дополнительных сложностей количественного определения скоростей гидролиза на тяжелой цепи, отмеченных выше, большинство данных, чтобы охарактеризовать скорости гидролиза самостабилизирующихся малеимидов сконъюгированных с антителом, определяли на основе оценки гидролиза легкой цепи.

Одно из ограничений этой методологии заключается в том, что процесс электрораспылительной ионизации имеет тенденцию давать небольшую долю натриевых аддуктов в наблюдаемых пиках (приблизительно 10% в условиях, использованных, чтобы сгенерировать данные на Фигуре 2), которые имеют наблюдаемую массу на 22 Дальтон больше, чем родительская масса. Многие масс-спектрометры не обладают достаточно высоким разрешением, чтобы отличить эту прибавку массы +22 от прибавки массы +18, которая является результатом гидролиза одного белка с общей молекулярной массой, превышающей 25 000 Дальтон. Следовательно, на ранних моментах времени, когда степень гидролиза низка, появление пика на приблизительно +20 Дальтон является сочетанием этих двух эффектов, которые не могут быть легко разделены экспериментально. Как результат, оценка процента гидролизованного продукта на самых

ранних моментах, вероятно, завышена, но интенсивность этих эффектов уменьшается по мере того как реакция движется в направлении завершения.

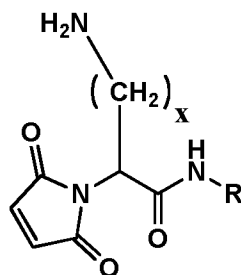
Пример 5 – Оценка промежутка между малеимидом и основной группой Самостабилизирующейся Линкерной области

Была принята гипотеза, что присутствие основной группы по соседству с малеимидом могло бы ускорить гидролиз тиосукцинимидов, изготовленных из этих малеимидов и тем самым привести к получению стабильных биоконъюгатов. Расстояние между малеимидом и основной аминок группой признается важным параметром в конструировании таких самостабилизирующихся групп. Чтобы оценить роль этого промежутка, был изготовлен ряд малеимидов с общей структурой



где x варьировался от 1 до 4. Эти малеимиды были затем сконъюгированы с полностью восстановленным человеческим IgG1 при pH8 и 37°C и сразу же исследовались при помощи электрораспылительной масс-спектрометрии, чтобы определить скорость гидролиза. Расстояние между основной группой и малеимидом обратно пропорционально скорости гидролиза – то есть, чем больше расстояние, тем медленнее гидролиз. Этот результат иллюстрирует, что размещение основной аминок группы рядом с малеимидом приводит к повышению скорости гидролиза сукцинимидного кольца биоконъюгатов, изготовленных с малеимидом. Однако, даже при наименьшем промежутке, протестированном здесь ($x=1$), конъюгат антитела следует выдерживать при pH 8 и 37°C в течение приблизительно 5 часов, чтобы достичь полного гидролиза (около 5 полужизней). Подвержение антитела или другого белка таким условиям в течение более длительных периодов потенциально может привести к ковалентным модификациям и неправильному скручиванию, и, таким образом, нужны были малеимиды с еще более высокими скоростями гидролиза.

Чтобы изготовить биоконъюгаты с более высокими скоростями гидролиза, был изготовлен ряд малеимидов с общей структурой



где x = от 1 до 4 и R = Вал-Цит-РАВ-ММАЕ. Эти малеимиды были затем сконъюгированы с полностью восстановленным человеческим IgG1 при pH8 и 37°C и сразу же исследовались при помощи электрораспылительной масс-спектрометрии, чтобы определить скорость гидролиза. Как показано на Фигуре 4 (вверху), расстояние между основной группой и малеимидом в пределах этого ряда структурно родственных соединений оказывает сильное влияние на протекание реакции гидролиза. Как в предыдущем примере, чем меньше расстояние между малеимидом и основным амином, тем быстрее гидролиз. Так как основные условия (т.е. высокий pH), как известно, повышают скорость гидролиза малеимидного и сукцинимидного кольца, этот эффект, предположительно, является примером внутримолекулярного катализа по преобладающему основному механизму. В пределах приведенного ряда соединений при $x=2$ и $x=3$ полного гидролиза не достигали и за 3 часа инкубации. Вместо этого достигали асимптоту при приблизительно 80% и 50%, соответственно (графики нормированы относительно максимально достигаемого гидролиза). Это явление может происходить из-за конкурирующей реакции, такой как прямая нуклеофильная атака первичного амина на сукцинимидном кольце, или может быть следствием изомерной примеси у малеимида, которая ведет к двухфазной кинетике гидролиза.

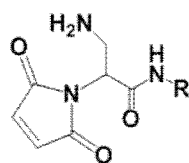
Пример 6 – Кинетика гидролиза

Предыдущие примеры иллюстрируют влияние, которое основная группа может оказывать на скорость гидролиза сукцинимидного кольца в биоконъюгате, в зависимости от расстояния между основной группой и малеимидом родительской молекулы. Однако, ожидается, что присутствие электроноакцепторных или -донорных групп также будет влиять на скорость гидролиза кольца, так как эти группы будут влиять на электронную плотность (и, следовательно, электрофильность) при карбонильном углероде кольца. В конъюгатах примера 5 карбоксамидная группа присутствует в альфа-положении относительно азота кольца (т.е. атом углерода присутствует между азотом кольца и карбонильным углеродом карбоксиамида). Поскольку карбоксамид является слабой электроноакцепторной группой, его присутствие, вероятно, влияет на наблюдаемые

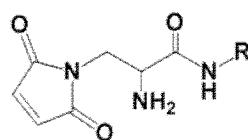
скорости гидролиза. Чтобы лучше понимать относительные вклады основной аминогруппы и электроноакцепторной карбоксамидной группы на наблюдаемые скорости гидролиза, ряд малеимидов был сконъюгированы с восстановленным человеческим антителом IgG1 при pH 7,4, 22°C, и скорость гидролиза определяли масс-спектрометрией (Фигура 5). Эти малеимиды содержали только карбоксамид в альфа-положении (треугольники), только первичный амин в бета-положении (перевернутые треугольники), или и карбоксамид, и первичный амин (круги). Контрольный малеимид, которые не содержал никаких групп поблизости от малеимида, также был исследован, хотя его гидролиз был слишком медленным, так что в этих условиях реакции не наблюдалось и данные не показаны на графике. В этих условиях самостабилизирующийся малеимид, который содержал и основную, и электроноакцепторную группу, давал биоконъюгат с периодом полугидролиза всего лишь 12 минут, в то время, как у малеимида, содержащего только амин, период полугидролиза составлял 2,5 часа, и у малеимида, содержащего только карбоксамид - 24 часа. Этот результат показывает, что основная группа и электроноакцепторная группа действуют совместно, давая конъюгаты с очень быстрой кинетикой гидролиза, что очень хорошо подходит для производства биоконъюгатов в желаемых мягких условиях. Конъюгаты, изготовленные с диаминопропиононовым малеимидом (круги), проявляют идеальные характеристики гидролиза, с периодом полугидролиза менее чем 15 минут в очень мягких условиях и реакцией, достигающей 100% завершения за время около 2 часов.

Пример 7 – Оценка промежутка между малеимидом и карбоксамидной группой Самостабилизирующейся Линкерной области

Быстрый и полный гидролиз сукцинимиды, наблюдаемый у конъюгатов, изготовленных со самостабилизирующимися диаминопропиононовыми малеимидными лекарство-линкерами (DPR), показанных в примерах 5 и 6 выше, показывает важность и основной группы, и электроноакцепторной группы в конструировании конъюгатов. Второй, изомерный малеимидный лекарство-линкер был изготовлен с диаминопропиононовой кислотой, чтобы дополнительно оценить роль этих двух компонентов в протекании гидролиза получающихся в результате конъюгатов. Структуры названы α -малеимидо DPR и β -малеимидо DPR и показаны ниже.



α -малеимидо DPR



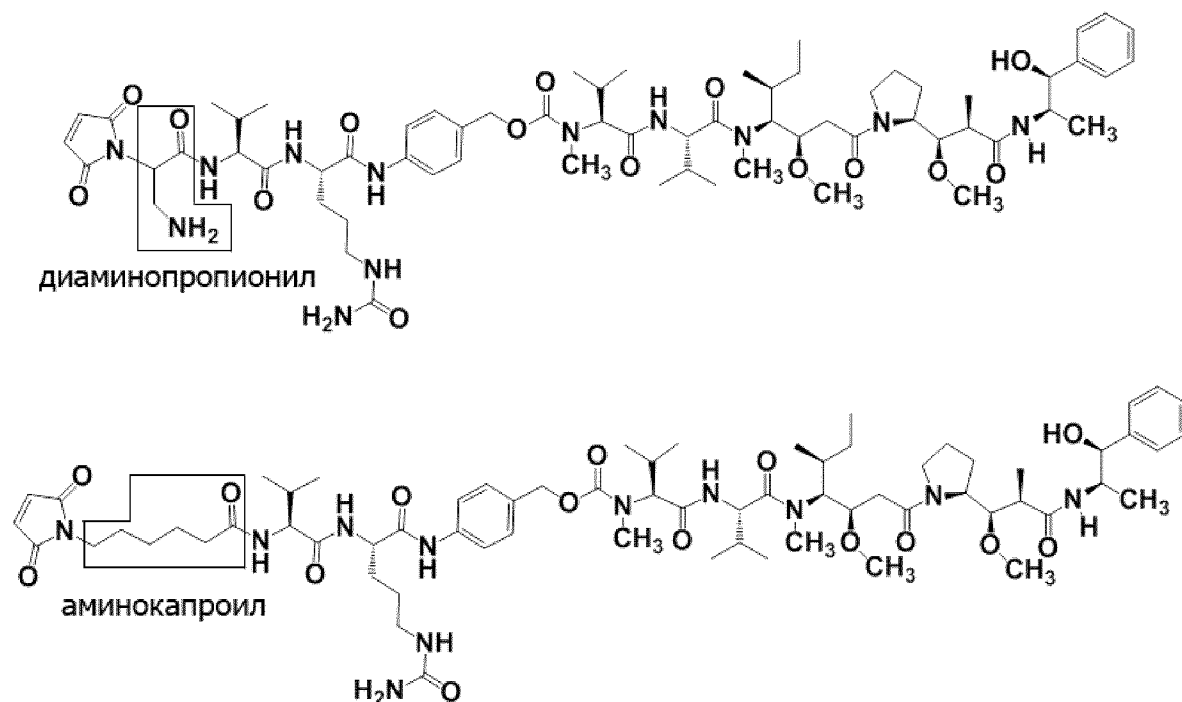
β -малеимидо DPR

R = Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

Оба DPR малеимида содержат один основной первичный амин, который отделен от малеимидного азота двумя атомами углерода. Оба также содержат электроноакцепторную карбоксамидную группу, однако расстояние от малеимидного азота карбоксамида варьируется от 1 до 2 углеродных единиц (α и β , соответственно). В результате промежутки между основным амином и карбоксамидом также варьируются от 1 до 2 углеродных единиц (β и α , соответственно). В совокупности это означает, что в β -DPR карбоксамид оказывает меньшее электроноакцепторное влияние на малеимидное кольцо, но большее электроноакцепторное влияние на первичный амин, относительно α -DPR. Ожидалось замедление скорости гидролиза в результате уменьшения как электрофильности малеимида, так и основности первичного амина. Когда эти малеимидные лекарство-линкеры были сконъюгированы с восстановленным антителом и проверены на гидролиз сукцинимиды, наблюдали 17-кратное снижение скорости гидролиза для β -DPR относительно α -DPR (Фигура 6). Этот пример иллюстрирует, как относительное расположение основной группы и электроноакцепторной группы может быть использовано, чтобы 'регулировать' скорость гидролиза.

Примеры 8 - 15

Чтобы оценить стабильность и фармакологическую активность ADC, изготовленных с самостабилизирующимися лекарство-линкерами, был изготовлен самостабилизирующийся малеимидный лекарство-линкер. Этот лекарство-линкер содержит малеимидо-DPR группу, присоединенную к цитотоксическому агенту ММАЕ через отщепляемую протеазой Вал-Цит РАВ саморасщепляющуюся группу (называемую здесь как малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ). Для сравнения был использован несамостабилизирующийся лекарство-линкер (называемый здесь малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ). Единственное различие между этими веществами – группа между малеимидом и валиновой группой линкера Вал-Цит. Малеймидные группы этих лекарство-линкеров могут быть изготовлены, используя малеиновый ангидрид и моно-защищенную диаминопропионовую кислоту и аминокaproоновую кислоту соответственно.



Пример 8 – Оценка стабильности конъюгатов Лиганд-Лекарство в буфере

В стандартных буферных системах отщепление малеимида от биоконъюгата, изготовленного с использованием тиол-малеимидной химии, в основном не поддается обнаружению, потому что отщепленный малеимид быстро снова реагирует с тиолом, приводя к равновесию, которое в значительной степени сдвинуто в сторону интактного конъюгата. Однако, добавление улавливателя тиола к буферу приводит к системе, в которой малеимид, который отщеплен от биоконъюгата, может вместо этого реагировать с улавливателем, приводя к стойкой, поддающейся наблюдению потере малеимида белком. Эксперимент, использующий такую систему, был осуществлен с конъюгатами антитело-лекарство, изготовленными с самостабилизирующимся диаминопропиониловым (DPR) малеимидным лекарство-линкером параллельно с несамостабилизирующимся капроильным лекарство-линкером. ADC были изготовлены с 8 лекарствами на антитело из малеимида-DPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ или малеимида-капроил-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ, используя полностью восстановленный гуманизированный IgG1. Наличие лекарственного вещества было подтверждено обращенно-фазовой ВЭЖХ на полимерной колонке PLRP-S, как описано ранее (Sun 2005). Полный гидролиз сукцинимид Самостабилизирующегося Линкера был также подтвержден при помощи электрораспылительной масс-спектрометрии. Эти ADC были помещены в 150 мМ Трис-буфера, pH 8, при 2,5 мг/мл, содержащего 10 мМ N-ацетилцистеина в качестве улавливателя, и инкубированы в течение 2 недель при 37°C. В семь моментов времени на протяжении инкубации отбирали аликвоты каждого ADC и замораживали при -80°C. По завершении периода исследования все образцы анализировали описанным выше способом обращенно-фазовой ВЭЖХ, чтобы

определить соотношение лекарство:антитело. Результаты этого исследования показаны на Фигуре 7. ADC, изготовленные со самостабилизирующимся DPR малеимидо лекарство-линкерами, проявляли минимальную потерю лекарства в течение периода исследования (от 8,0 до 7,9 лекарств на антитело за 14 дней), тогда как ADC, изготовленные с капроильно-малеимидным лекарство-линкером, теряли приблизительно половину от своего содержания лекарства (от 8,0 до 3,9 лекарств на антитело за 14 дней) в этих условиях.

Пример 9 – Стабильность в плазме Ex Vivo (обращенно-фазовый метод)

Оценка содержания лекарственного вещества гуманизированных ADC в образцах плазмы, не принадлежащих человеку, способом обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанным в Примере 8, может быть достигнута изоляцией ADC со смолой IgSelect (GE Healthcare), которая селективно связывается с человеческим доменом Fc. ADC были изготовлены с 8 лекарствами на антитело из малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-MMAE или малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-MMAE с использованием полностью восстановленного человеческого IgG1. Эти ADC (0,25 мг/мл) инкубировали в стерильной плазме крыс в течение 7 дней при 37°C. В семь моментов времени на протяжении инкубации, а 50 мкл аликвоты каждого ADC отбирали и замораживали при -80°C. По завершении периода исследования, ADC очищали из каждого образца и анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ, чтобы определить соотношение лекарство:антитело. Результаты этого исследования показаны в виде графика на Фигуре 8. Как наблюдалось в буфере, инкубация ADC, изготовленного с самостабилизирующимся малеимидом, в плазме крыс также приводила к маленьким или необнаружимым потерям лекарства в условиях, которые приводили к потере приблизительно половины лекарства из малеимидо-капроильного ADC.

Пример 10 – Стабильность в плазме Ex Vivo (способ конъюгированного лекарства)

Второй формат анализа был использован, чтобы оценить стабильность ADC в плазме крысы и человека *ex vivo*. ADC были изготовлены с 4 лекарствами на антитело из малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-MMAE или малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-MMAE, используя человеческий IgG1, частично восстановленный до уровня 4 тиолов на антитело (приводя к получению ADC с 4 лекарствами на антитело). Эти два ADC были введены в плазму человека и крысы и инкубированы при 37°C в течение 7 дней. В семь моментов времени на протяжении инкубации отбирали аликвоты и замораживали -80°C вплоть до завершения периода исследования. ADC затем изолировали из каждого образца и MMAE высвобождали протеолитически из изолированных ADC, как описано ранее (Sanderson 2005). Высвобожденный MMAE затем определяли количественно ЖХ-МС/МС и

нормировали относительно начального значения для каждого ADC (Фигура 9). В плазме как крысы, так и человека, ADC, изготовленный из самостабилизирующегося малеимида, терял меньше или вообще не терял лекарство в этих условиях, в то время как приблизительно половина лекарства была потеряна из малеимидо-капроильного ADC.

Пример 11 – Стабильность *In Vivo*

Как описано в примере 10 выше, соотношение лекарство:антитело может быть измерено для ADC в плазме крысы обращенно-фазовой ВЭЖХ, следующей за очисткой на смоле IgSelect. Этот способ применяли к образцам, полученным в опытах по фармакокинетике *in vivo* на крысах. ADC были изготовлены с 4 лекарствами на антитело из малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ или малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ, используя гуманизированный IgG1, частично восстановленный до в среднем 4 тиолов на антитело (приводя к получению соотношения лекарство:антитело, равного 4). Эти ADC далее очищали как описано ранее (Sanderson 2005), хроматографией с гидрофобным взаимодействием, чтобы изолировать виды, содержащие 4 лекарства на антитело. Эти ADC вводили внутривенно при 10 мг/кг крысам Sprague-Dawley. В пять моментов времени три животных из каждой дозовой группы были умерщвлены, и собранная кровь была переработана до плазмы и заморожена при -80°C. По завершении исследования все образцы были обработаны смолой IgSelect способом, описанным выше, за исключением того, что объем образца варьировался. Соотношение лекарство:антитело в каждый момент времени в этом исследовании показано в виде графика на фигуре 10. Как наблюдали в плазме крыс *ex vivo*, ADC, изготовленный с самостабилизирующимся малеимидом, проявляет минимальную потерю лекарства *in vivo*, которая падает с начального значения 4,1 лекарства на антитело до значения 3,6 лекарства на антитело (12% восстановления) после 7 дней. В течение этих же временных рамок, соотношение лекарство:антитело для ADC, изготовленного с малеимидо-капроильным линкером, упало от начального значения 3,9 до значения 1,5 (61% восстановления). Это иллюстрирует, что повышенная стабильность самостабилизирующегося лекарство-линкера которая наблюдается, *ex vivo* существует и в условиях *in vivo*.

Пример 12 – Фармакокинетика

Поскольку малеимидо-капроильные ADC, как доказано, теряют лекарство путем отщепления малеимида, в то время как самостабилизирующегося малеимидные ADC - нет, резонно предположить, что воздействие сконъюгированного с антителом лекарства будет больше, заменяя эквивалентные дозами двух ADC. Чтобы подтвердить это предположение, были изготовлены ADC с 4 лекарствами на антитело из малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ или малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ, используя

человеческий IgG1, частично восстановленный до в среднем 4 тиолов на антитело (приводя к отношению лекарство : антитело 4). Эти два ADC были введены в дозе 2 мг/кг крысам Sprague-Dawley, и образцы крови отбирали в семь моментов времени и перерабатывали до плазмы. Эти образцы плазмы, согласно стандартам каждого ADC для построения калибровочной кривой, подвергали захвату на смоле mAb Select и проводили процедуру высвобождения папаином, описанную в примере 10 выше, чтобы измерить концентрацию сконъюгированного с антителом MMAE. Концентрации лекарства, сконъюгированного с антителом, были выше для ADC, изготовленного со самостабилизирующимся лекарство-линкером, с усиливающейся со временем разницей (данные не показаны). Исходные концентрации сконъюгированного с антителом лекарства совпадали, отражая эквивалентность дозы и отношения лекарство : антитело у ADC. Однако, с первого дня наблюдали различия, достигающие двукратной разницы к 3-му дню. Эти более высокие концентрации приводили к приблизительно на 40% большей площади под кривой для самостабилизирующегося ADC относительно малеимидо-капроильного ADC.

Пример 13 – Токсикология

Чтобы оценить влияние самостабилизирующихся малеимидов на токсикологию, ADC были изготовлены с 4 лекарствами на антитело из малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-MMAE или малеимидо-капроил-Вал-Цит-РАВ-MMAE, используя гуманизированный IgG1 (который, как известно, не связывается с какими-либо антигенами крысы), частично восстановленный до в среднем 4 тиола на антитело (приводя к среднему отношению лекарство : антитело 4). Эти ADC вводили внутривенно самкам крыс CD®IGS (Charles River Laboratories) в дозе 10 мг/кг (6 крыс на опытный образец плюс 6 крыс, получающих только плацебо (основу)). Перед введением и в 3 момента времени после введения образцы крови отбирали для гематологического анализа и химического анализа сыворотки крови на биомаркеры токсичности. Нейтропения, индуцированная ADC с MMAE, была несколько ниже для самостабилизированных конъюгатов, чем для малеимидо-капроильных ADC (данные не показаны).

Пример 14 – Концентрация в плазме высвобожденного лекарства

Токсикологический эксперимент, описанный в примере 13 выше, также включал в себя взятие крови через час и через 24 часа после введения, и эти образцы наряду с образцами, взятыми на 4-й и 7-й день после введения, анализировали на присутствие неконъюгированного MMAE в плазме методом ЖХ-МС/МС. Результаты этого анализа показывают, что пиковые концентрации циркулирующего MMAE примерно в 2 раза ниже для самостабилизирующегося малеимидо-DPR-Вал-Цит-РАВ-MMAE ADC относительно

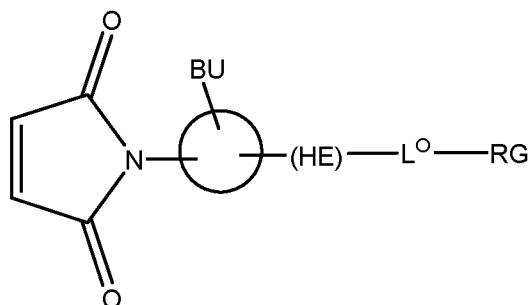
малеими́до-капроил-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ (данные не показаны).

Пример 15. Ксенотрансплантатная активность

Чтобы оценить влияние самостабилизирующихся лекарство-линкеров на противоопухолевую активность ADC, были изготовлены конъюгаты с анти-CD30 антителом сAC10, используя лекарство-линкеры, содержавшие Вал-Цит-РАВ-ММАЕ как цитотоксическую нагрузку, присоединенную к антителу через либо малеими́до-капроильную группу, либо самостабилизирующуюся малеими́до-DPR группу. Эти ADC оценивали на двух отдельных мышиных ксенотрансплантатных моделях из CD30+ злокачественных образований человека. У первой модели (Фигура 11), Karpas-299 (human ALCL) клетки были имплантированы подкожно самкам мышей SCID, и опухоли позволили расти до объема приблизительно 250 мм³ перед приемом по 1 мг/кг еженедельно для трех доз (шесть мышей на дозовую группу). Все шесть мышей, принимавших малеими́до-капроильный ADC, демонстрировали некоторую задержку роста опухоли относительно необработанной группы, и два животных демонстрировали частичное сокращение опухоли; однако в итоге все опухоли вырастали, и вся группа была умерщвлена с большими опухолями. Дозовая группа с самостабилизирующимся ADC демонстрировала полную ремиссию (отсутствие выявляемой опухоли) у всех шести животных, 5 животных демонстрировали продолжительную ремиссию в процессе исследования, и только одно животное было забито после того, как опухоль вернулась на 55-й день исследования. Результаты этого исследования показывают значительно большую антиопухолевую активность *in vivo* для ADC, изготовленного со самостабилизирующимся лекарство-линкером. На второй модели, L428 (человеческая лимфома Ходжкина) клетки имплантировали подкожно самкам мышей NSG, и опухоли позволили расти до объема приблизительно 100 мм³ перед приемом по 1 мг/кг каждые четыре дня для 4 доз (шесть мышей на дозовую группу). Все животные в обеих дозовых группах с ADC демонстрировали значительную задержку роста во время лечения, однако все опухоли начали разрастаться после 28-го дня исследования без значительных различий между малеими́до-капроильными и самостабилизирующимся ADC. Таким образом, улучшение антиопухолевой активности, наблюдаемое со самостабилизирующимся ADC в ксенотрансплантатных исследованиях, как представляется, модели-зависимо.

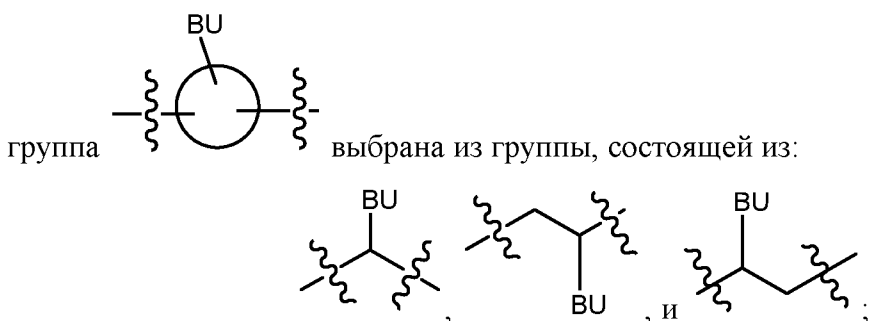
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Линкер, имеющий формулу:



или его соль, где

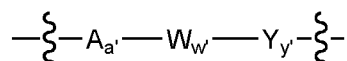
RG представляет собой реакционноспособную группу, содержащую реакционноспособный участок на конце L^O , пригодный для присоединения лекарственной группы, представляющей собой цитотоксическое средство;



BU представляет собой основную группу, выбранную из группы, состоящей из $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$, и $-(CH_2)_xNR^a_2$, где x - целое число 0-4 и каждый R^a независимо выбран из группы, состоящей из кислотолабильной защитной группы, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галоалкила, при условии, что имеется не менее, чем 2 промежуточных атома между основанием основной группы и атомом азота малеимида;

HE представляет собой карбонильную группу;

L^O представляет собой вторичную линкерную группу, имеющую формулу:



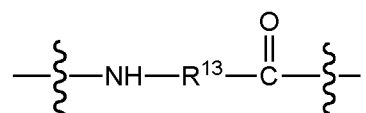
где -A- представляет собой расширитель, индекс a' равен 0 или 1; -W- представляет собой отщепляемую группу, индекс w' равен 0 или 1; и -Y- представляет собой разделительную группу, и индекс y' равен 0 или 1; и

волнистые линии показывают точки присоединения в формуле линкера.

2. Линкер по п. 1, в котором RG выбрана из группы, состоящей из сульфгидрильных групп, чтобы образовывать дисульфидные связи или простые тиоэфирные связи, альдегидных, кетонных и гидразиновых групп, чтобы образовывать

гидразоновые связи, карбоксильных и аминогрупп, чтобы образовывать пептидные связи, карбоксильных и гидроксигрупп, чтобы образовывать эфирные связи, сульфоновых кислот, чтобы образовывать сульфонамидные связи, спиртов, чтобы образовывать карбаматные связи, и аминов, чтобы образовывать сульфонамидные связи или карбаматные связи.

3. Линкер по п. 1, где индекс a' равен 1; и $-A_a-$ включает в себя расширяющую группу, выбранную из следующих: $-NH-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-NH-C_1-C_{10}$ алкилен- $NH-C(O)-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-NH-(CH_2CH_2O)_s-$, $-NH-(CH_2CH_2O)_s-CH_2-$, $-NH-(CH_2CH_2NH)_s-(CH_2)_s-$, $-NH-(CH_2CH_2NH)_s-(CH_2)_s-NH-C(O)-(CH_2)_s-$, $-NH-(C_3-C_8 \text{ карбоцикло})-$, $-NH-(\text{ариленин})-$, и $-NH-(C_3-C_8 \text{ гетероцикло})-$, где каждый s независимо равен 1-10; или $-A_a-$ имеет следующую формулу:

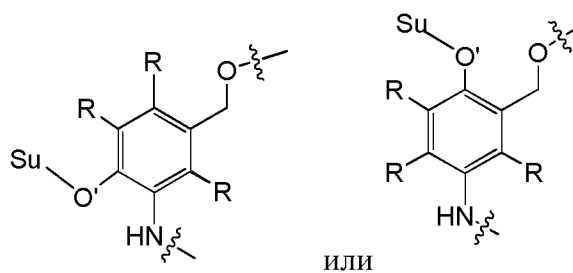


где волнистая линия у карбонильной группы показывает точку присоединения к остальной части L^O , а вторая волнистая линия показывает точку присоединения в формуле линкера; и

R^{13} представляет собой $-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-C_3-C_8$ карбоцикло-, -ариленин-, $-C_1-C_{30}$ гетероалкилен-, $-C_3-C_8$ гетероцикло-, $-C_1-C_{10}$ алкилен-ариленин-, -ариленин- $-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-C_1-C_{10}$ алкилен- $(C_3-C_8 \text{ карбоцикло})-$, $-(C_3-C_8 \text{ карбоцикло})-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-C_1-C_{10}$ алкилен- $(C_3-C_8 \text{ гетероцикло})-$, $-(C_3-C_8 \text{ гетероцикло})-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_{1-10}-(CH_2)_{1-3}-$, или $-(CH_2CH_2NH)_{1-10}-(CH_2)_{1-3}-$, предпочтительно $-C_1-C_{10}$ алкилен- или $-C_1-C_{30}$ гетероалкилен-, более предпочтительно R^{13} представляет собой $-C_1-C_{10}$ алкилен-, $-(CH_2CH_2O)_{1-10}-(CH_2)_{1-3}-$ или $-(CH_2CH_2NH)_{1-10}-(CH_2)_{1-3}-$.

4. Линкер по п. 1, где w' равен 1; и $-W_w-$ представляет собой $-(-AA-)_{1-12}-$ или $-AA-AA-)_{1-6}$, где AA в каждом случае независимо выбран из природных или неприродных аминокислот, предпочтительно независимо выбран из природных аминокислот, и связь между отщепляемой группой (W) и присоединенной лекарственной группой (D) или разделителем (Y) является ферментативно расщепляемой под действием связанной с опухолью протеазы, предпочтительно катепсина В, С и D, или плазминовой протеазы.

5. Линкер по п. 1, где индекс w' равен 1; индекс y' равен 1; и $-W_w-Y_y-$ является глюкуронидной группой, имеющей структуру



где Su - фрагмент молекулы сахара;

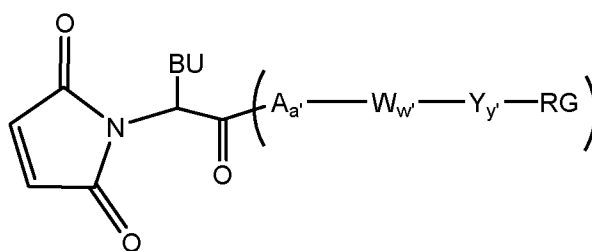
-O'- означает гликозидный мостик, который является сайтом расщепления β -глюкуронидазой, который расщепляется лизосомальной β -глюкуронидазой человека;

каждый R независимо является водородом, галогеном, -CN, или -NO₂;

волнистая связь, прилегающая к атому азота, означает ковалентное присоединение к расширителю (A); и

волнистая связь, прилегающая к кислороду, означает ковалентное присоединение к лекарственной группе (D) через карбонатную или карбаматную группу.

6. Линкер по п. 2, имеющий следующую формулу:

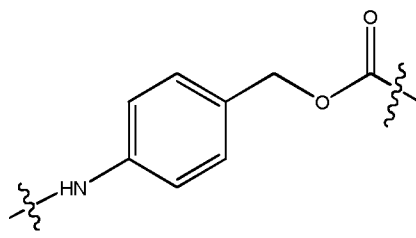


где BU представляет собой -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, или -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, или их защищенные кислотолабильными группами формы.

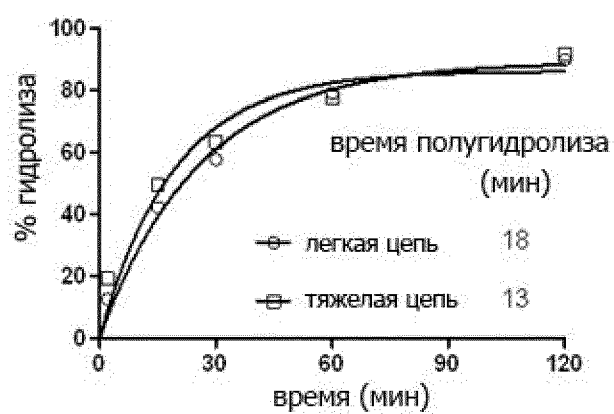
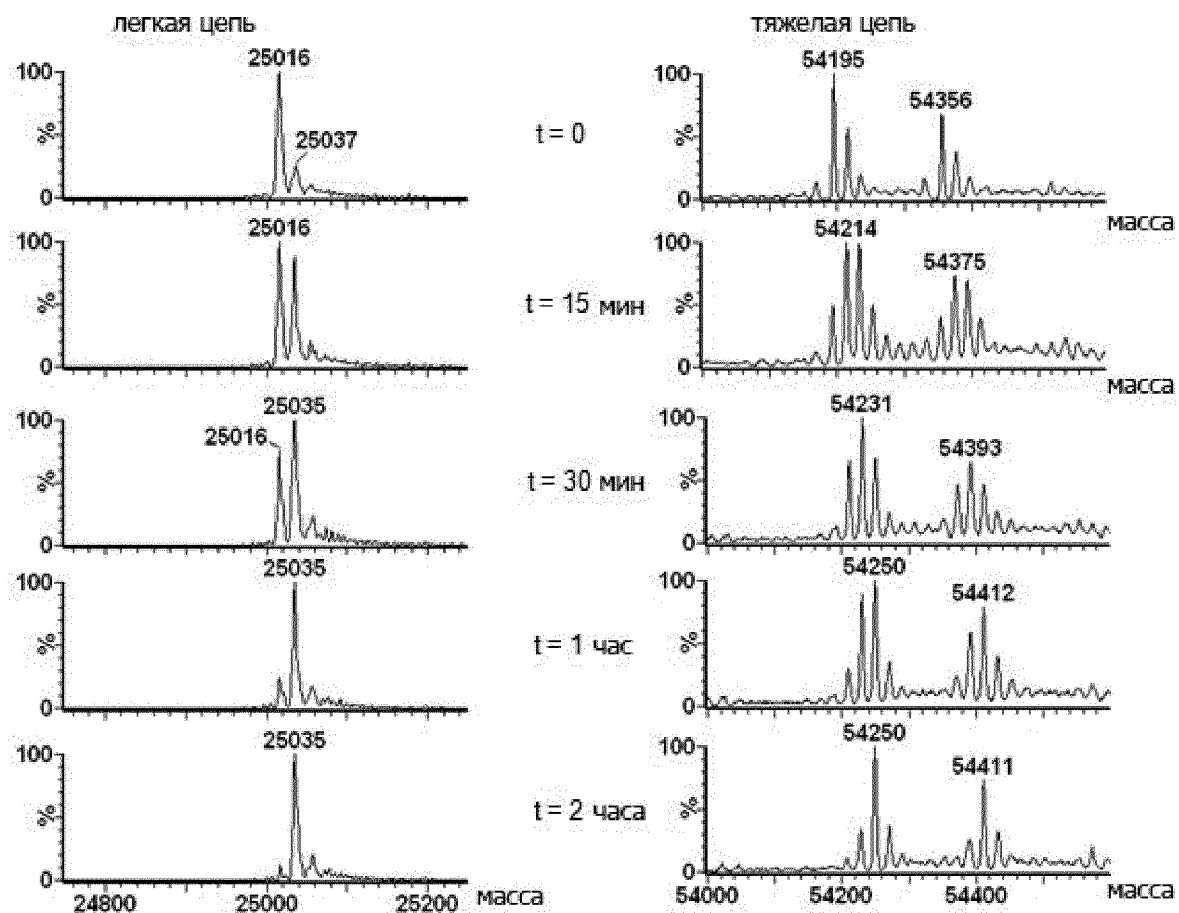
7. Линкер по п. 6, в котором a' равно 0, и W_{w'} представляет собой дипептид.

8. Линкер по п. 7, в котором W_{w'} выбран из группы, состоящей из Вал-Цит, Фен-Лиз или Вал-Ала.

9. Линкер по любому из п.п. 6-8, в котором Y_{y'} представляет собой группу PAB, имеющую формулу

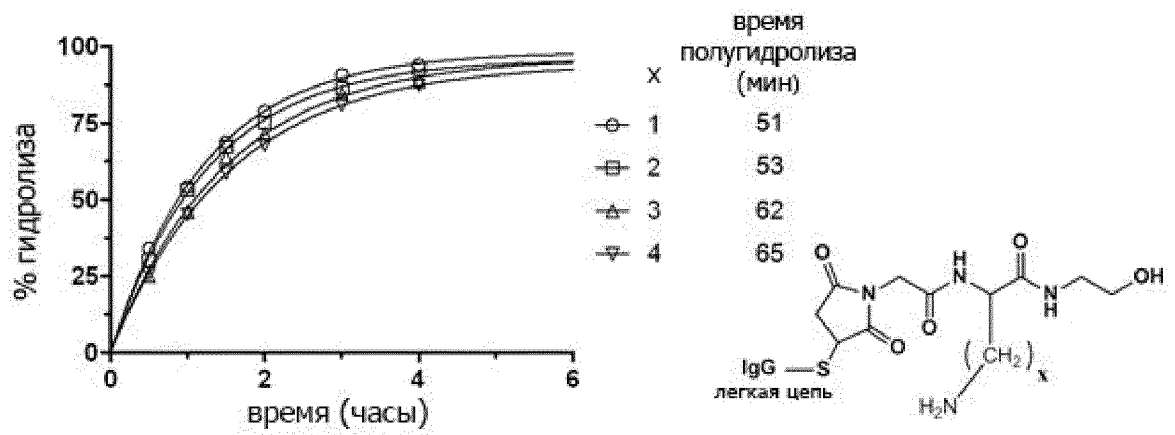


где волнистая линия у атома углерода карбонильной группы показывает точку присоединения к лекарственной группе (D), а вторая волнистая линия показывает точку присоединения к остальной формуле линкера.



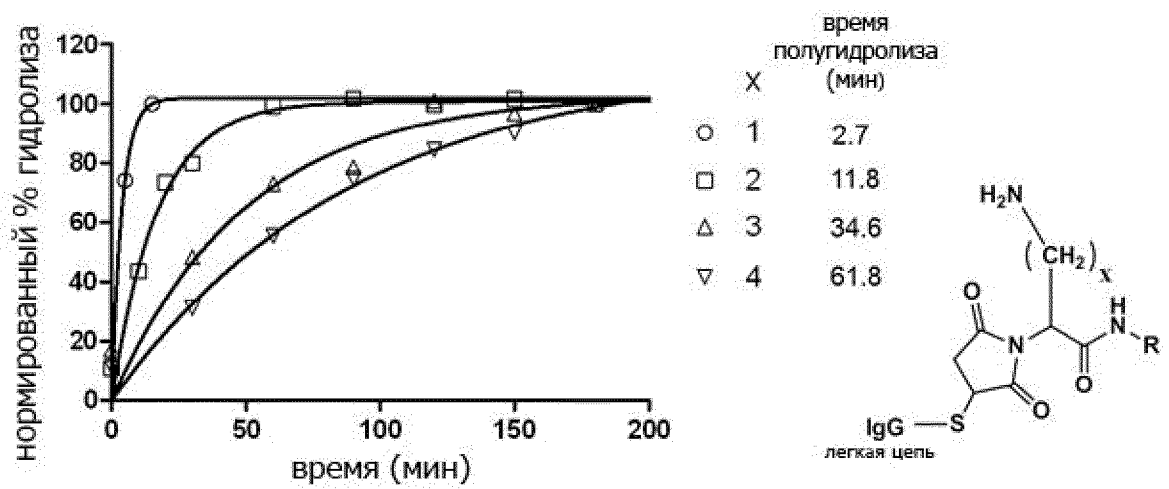
Фиг. 2

3/8



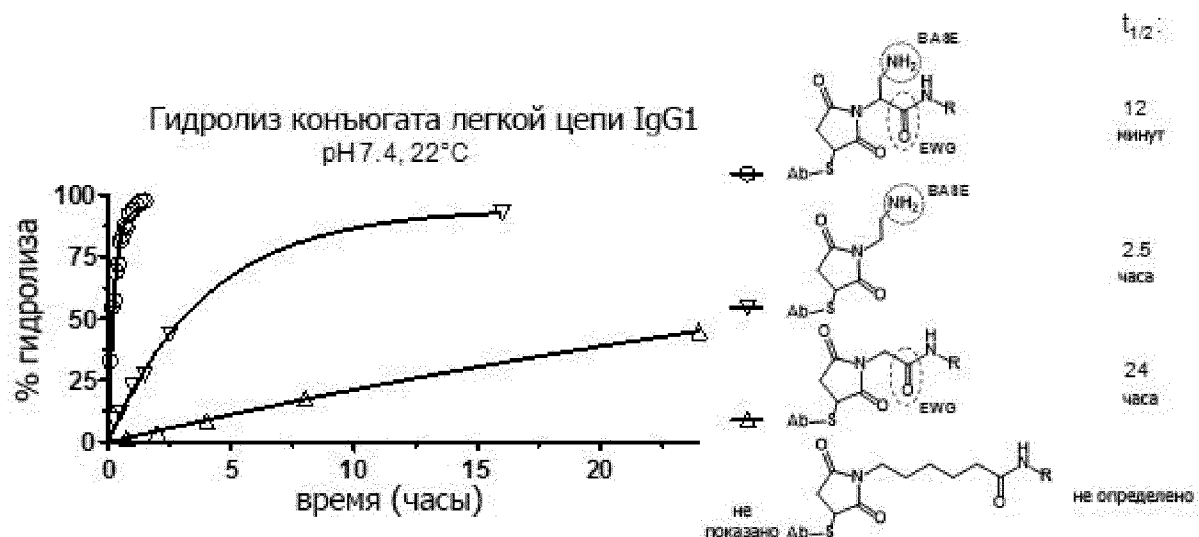
Фиг. 3

5

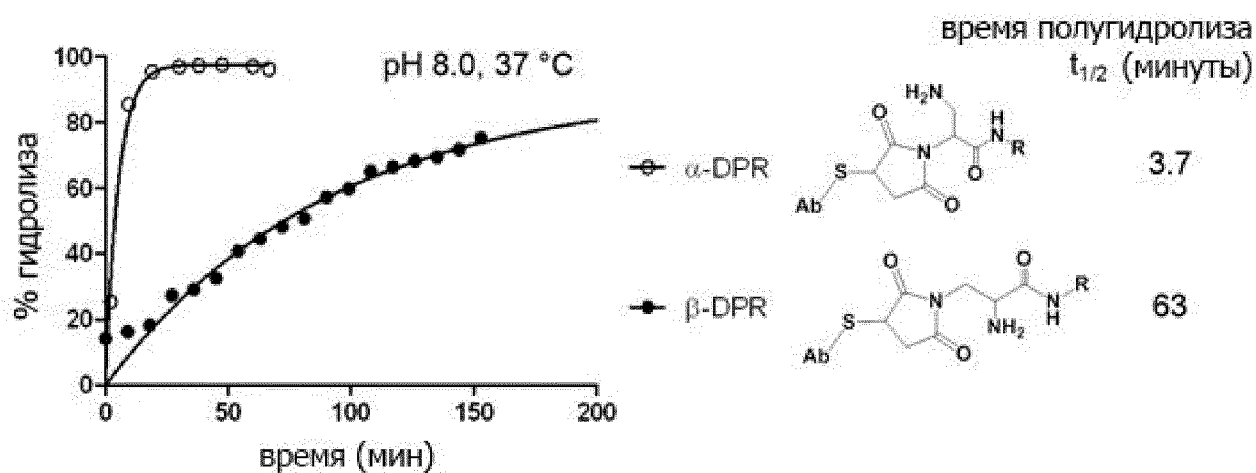


Фиг. 4

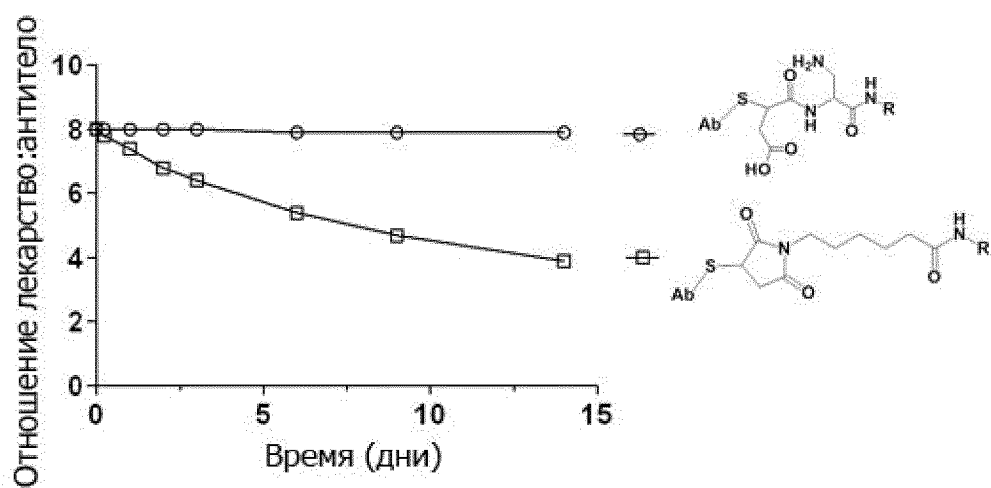
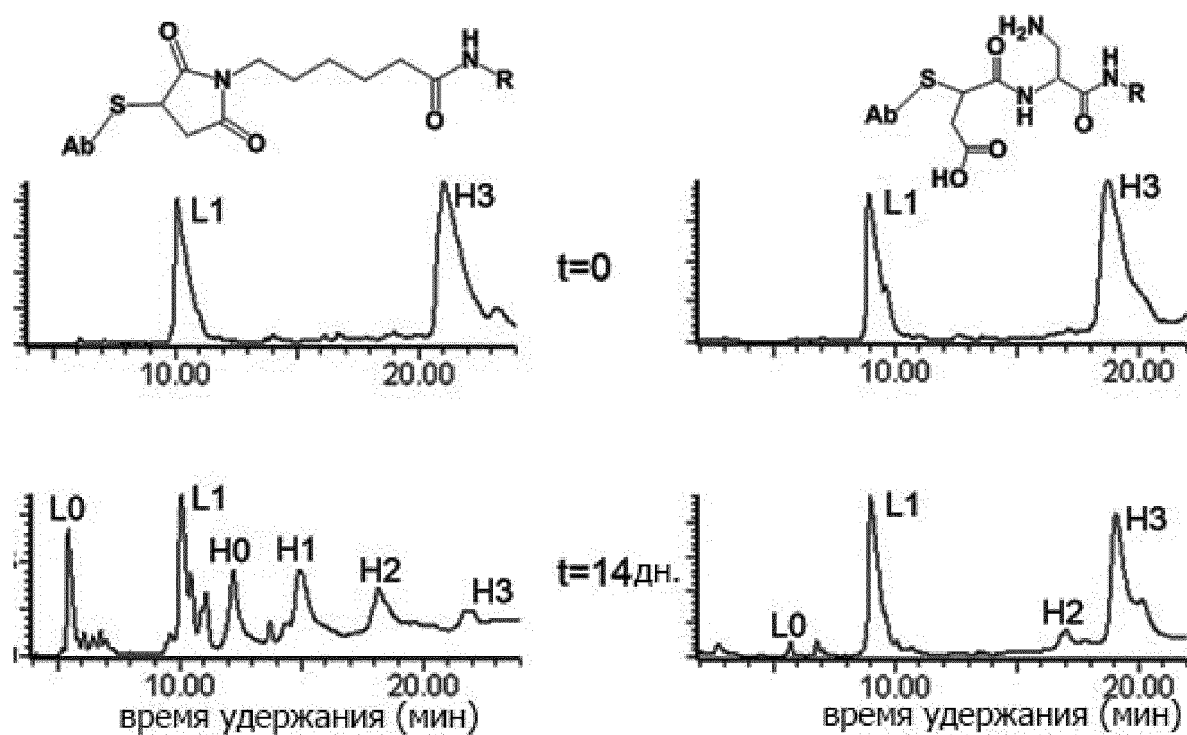
10



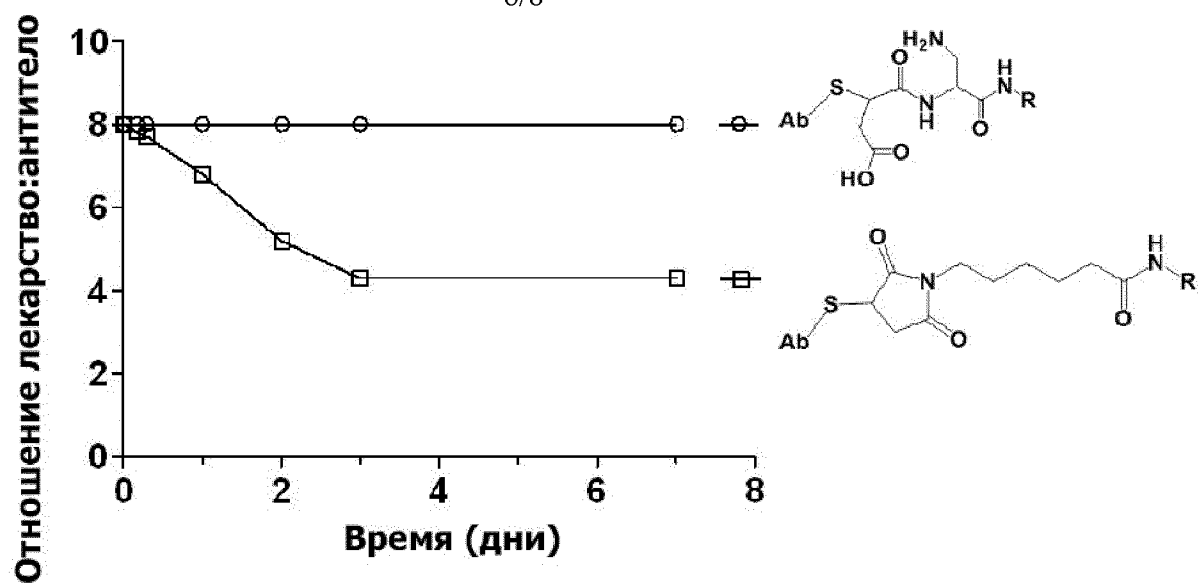
Фиг. 5



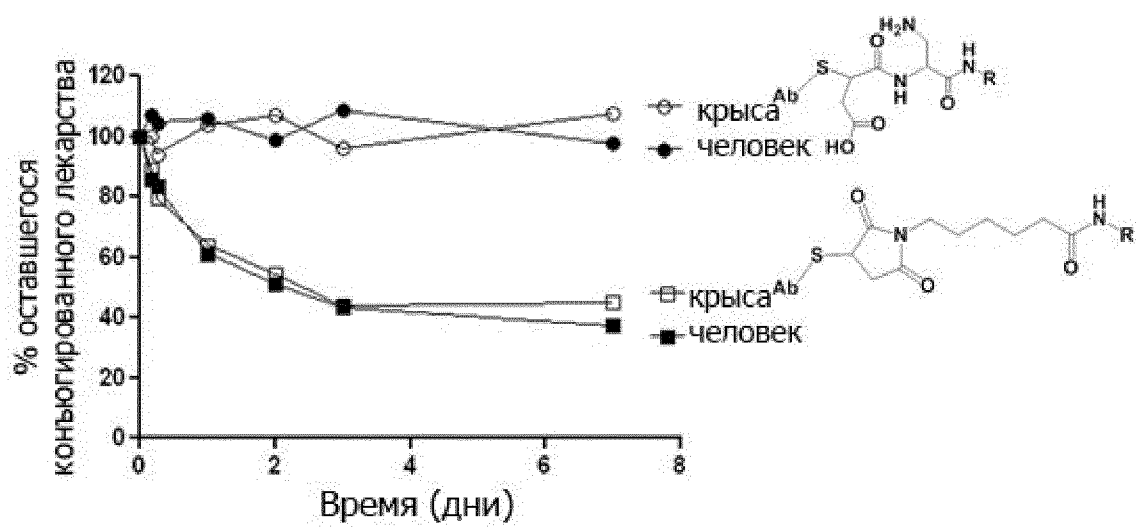
Фиг. 6



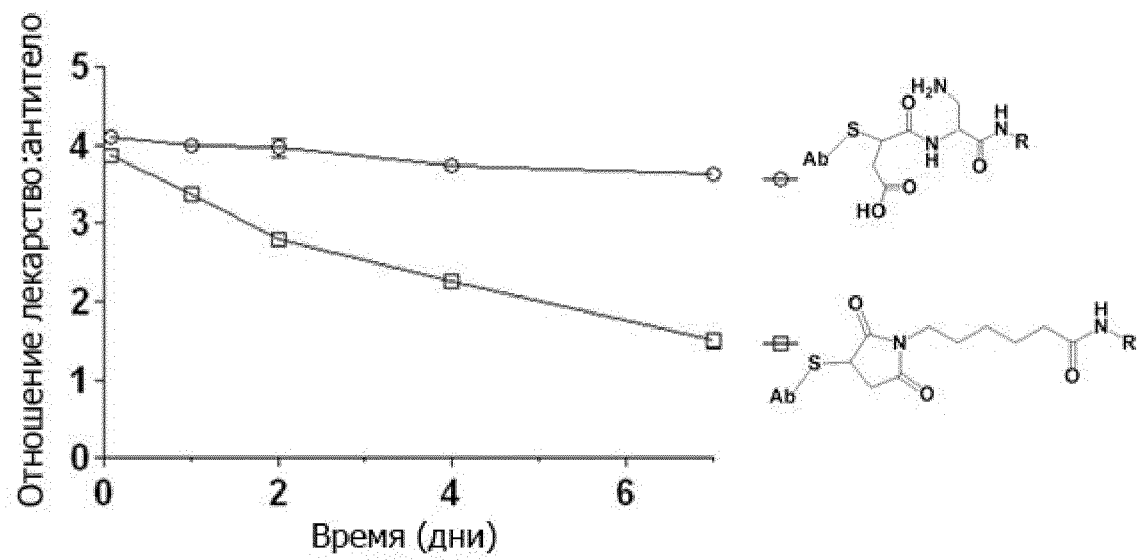
Фиг. 7



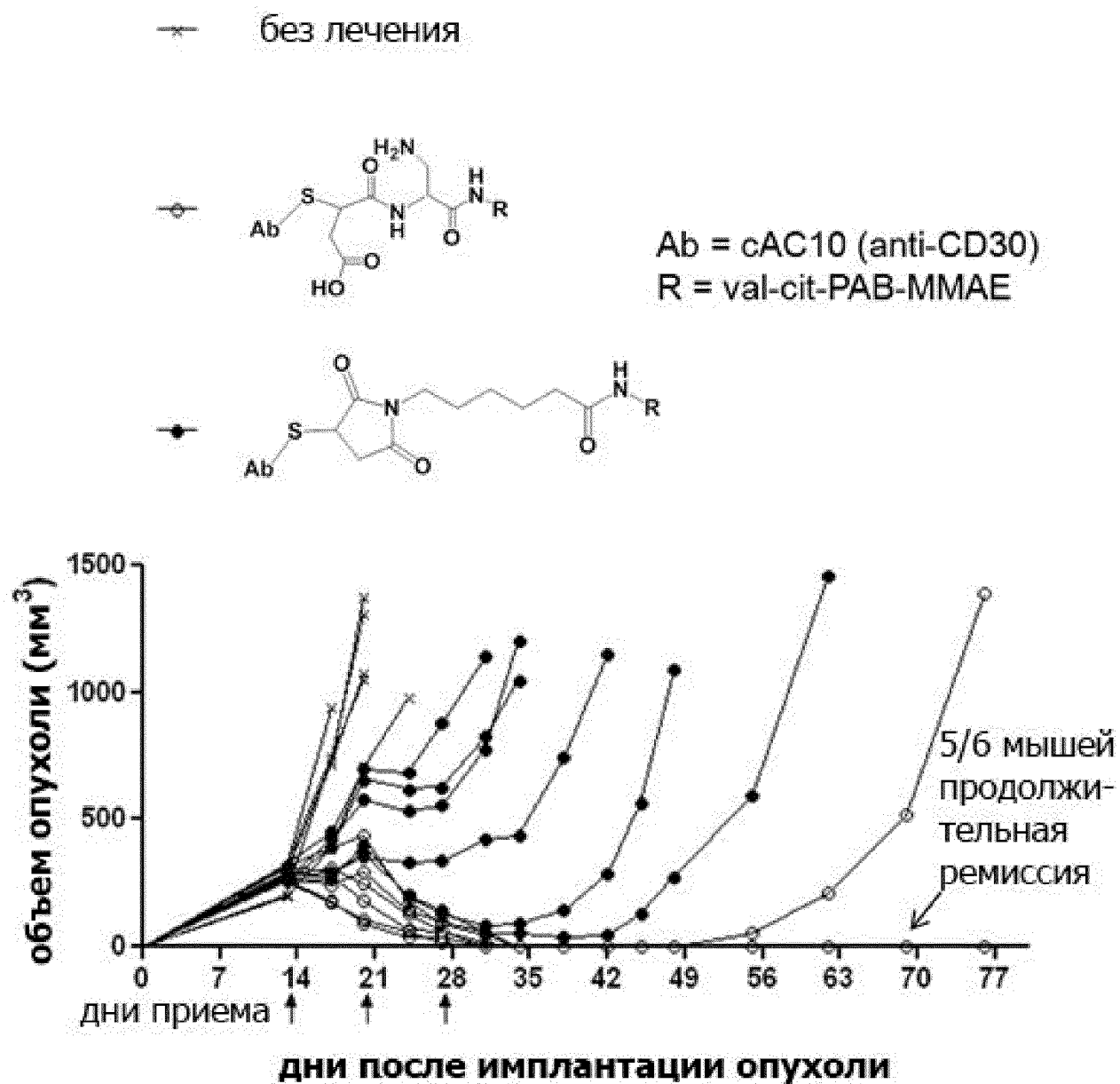
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11